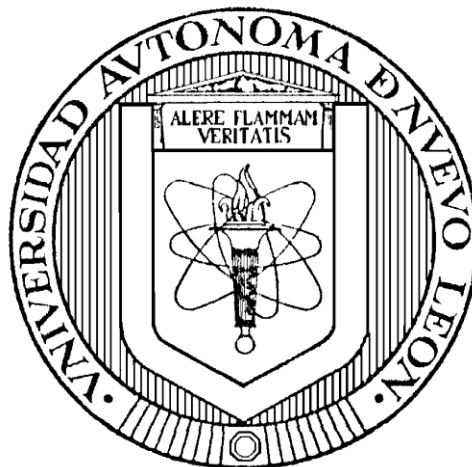


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZANDO  
BIOREDUCTORES Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN SENSORES  
PLASMÓNICOS**

**Por**

**JESÚS ÁNGEL VALDEZ AGUILAR**

**Como requisito para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
Orientación en Química de los Materiales.**

**Diciembre, 2015**

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZANDO  
BIOREDUCTORES Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN SENSORES  
PLASMÓNICOS**

Aprobación de la Tesis

---

Dra. Idalia Gómez de la Fuente, Asesora de Tesis

---

Dra. Yolanda Peña Méndez

---

Dr. Alejandro Vázquez Dimas

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez, Subdirectora de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera agradecer a Dios, mi familia y mis amigos por acompañarme estos dos años en este proceso, al darme su apoyo, alegría y sus buenos deseos.

También dar mi profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Químicas y al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca y el apoyo tanto académico como científico para la realización de este proyecto de investigación. Así mismo a la *Alabama State University* y al *Center for Nanobiotechnology Research* por recibirme para realizar mi estancia académica y por enseñarme y permitirme realizar parte del proyecto en sus respectivas instituciones.

A la Dra. Thelma Serrano, Dr. Alberto Gómez y al comité tutorial, por sus consejos, recomendaciones y ayudas hechas a este proyecto.

Y, por último, pero no menos importante a la Dra. Idalia Gómez por su ayuda, consejos, recomendaciones y lecciones, no solo de la parte académica, sino también de la parte profesional y personal que me han permitido desarrollarme en diferentes lugares a pesar del idioma y/o cultura, gracias a su formación, he adquirido la experiencia necesaria para poder desenvolverme en cualquier parte a donde yo vaya, tanto profesional como académicamente.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Introducción a la Nanobioteología .....	1
1.1.1 Aplicaciones.....	6
1.1.2 Biosensado .....	7
1.1.3 Bio-funcionalización de nanopartículas.....	9
1.1.4 Funcionalización con biomoléculas de bajo peso molecular.....	10
1.1.5 Funcionalización con ácidos nucleicos .....	11
1.1.6 Funcionalización con anticuerpos .....	12
1.1.7 Métodos de acoplamiento .....	14
1.1.8 Detección del RSV.....	16
1.1.9 Propósito del estudio .....	19
CAPÍTULO 2 .....	21
ANTECEDENTES.....	21
2.1 Síntesis de nanopartículas metálicas .....	22
2.2. Método asistido por microondas.....	25
2.3 Funcionalización de nanopartículas .....	28
2.4 Nanopartículas como sensores .....	31
2.5 Detección de RSV .....	32
2.6 Eficacia de la detección.....	34
2.8 Hipótesis.....	35
2.9 Objetivos .....	36
2.9.1 Objetivo general.....	36
2.9.2 Objetivos específicos .....	36
CAPÍTULO 3 .....	37



MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas metálicas.....	37
3.1.1 Análisis por FESEM.....	38
3.1.2 Análisis por TEM.....	39
3.2 Funcionalización de nanopartículas .....	39
3.2.1 Distribución del tamaño de partícula.....	41
3.2.2 Cuantificación del anticuerpo conjugado .....	41
3.3 Detección del virus RSV.....	42
3.3.1 Especificidad.....	42
3.4 Análisis estadísticos .....	43
CAPÍTULO 4.....	43
RESULTADOS.....	44
4.1 Síntesis, caracterización, funcionalización de las nanopartículas y detección del virus RSV utilizando a la L-cisteína. ....	44
4.1.1 Síntesis de las nanopartículas metálicas. ....	44
4.1.2 Funcionalización de las nanopartículas de oro. ....	47
4.1.3 Detección del virus RSV. ....	50
4.2 Síntesis, caracterización, funcionalización de las nanopartículas y detección del virus RSV utilizando al alginato de sodio. ....	52
4.2.1 Síntesis de las nanopartículas metálicas. ....	52
4.2.2 Funcionalización de nanopartículas.....	57
4.2.3 Detección del RSV.....	62
CAPÍTULO 5.....	77
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	77
5.1 Discusión de resultados para los experimentos con L-cisteína.....	77
5.2 Discusión de resultados para los experimentos utilizando alginato de sodio.....	82
CAPÍTULO 6.....	104
CONCLUSIONES .....	104
6.1 Recomendaciones y trabajo futuro.....	106
REFERENCIAS .....	107
APENDICES.....	115

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1 Interacción entre la energía (luz) y la nanopartícula metálica (Laboratory). .....	2
Figura 2 Proceso de la técnica de litografía de nanoesferas .....	3
Figura 3 Proceso de la técnica por EBL.....	4
Figura 4 Nanopartículas de oro y sus respectivos espectros UV-vis antes (rojo) y después (verde) de la funcionalización (A) y nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN (B)(Gill, Goeken, & Subramaniam, 2013).....	7
Figure 5 Desplazamiento del LSPR cuando se añade ADN a las nanopartículas esféricas de oro (Cytodiagnostics, 2015). .....	9
Figura 6 Esquema que muestra la interacción entre un anticuerpo y una superficie específica.....	14
Figura 7 Esquema que muestra la química de acomplamiento del EDC-NHS (technologies, 2015). .....	15
Figura 8 Esquema para todas las interacciones previstas y sus respectivos análisis UV-vis, el microorganismo externo para los experimentos de especificidad se representa como MO. E. ....	20
Figura 9 Solventes ordenados por su nivel de absorbancia de la energía de MW. ....	28

Figura 10 Análisis UV-vis para la síntesis de nanopartículas de cobre (A, B, C), plata (D, E, F) y oro (G, H, I) utilizando L-cisteína con un tiempo de reacción en MW de 3 min (A, D, G) 2 min (B, E, H) y 1 min (C, F, I).....	45
Figura 11 Micrografías FESEM para las nanopartículas metálicas de A) oro utilizando L-cisteína y B) magnificación de la micrografía. ....	46
Figura 12 Análisis EDS de mapeo elemental para las nanopartículas de oro (A y B) oro utilizando L-cisteína.....	47
Figura 13 Espectro UV-vis para los experimentos de funcionalización para las nanopartículas de oro utilizando un anticuerpo policlonal.....	48
Figura 14 A) Distribución del tamaño de partícula para las nanopartículas de oro antes y B) después de la funcionalización. ....	49
Figura 15 Potencial zeta para las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas de oro. ....	49
Figura 16 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas funcionalizadas de oro a 30 min (A) 60 min (B) y 120 min (C).....	50
Figura 17 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas no funcionalizadas de oro a 30 min (A, B y C) 60 min (D, E y F) y 120 min (G, H e I).....	51
Figura 18 Análisis UV-vis para la síntesis de nanopartículas de cobre (A, B, C), plata (D, E, F) y oro (G, H, I) utilizando alginato de sodio con un tiempo de reacción en MW de 3 min (A, D, G) 2 min (B, E, H) y 1 min (C, F, I). ....	53
Figura 19 Micrografías FESEM para las nanopartículas no funcionalizadas de A) cobre, B) plata y C) oro utilizando alginato de sodio.....	55

Figura 20 Análisis EDS de mapeo elemental para las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A y B), plata (C y D) de oro (E y F).....	56
Figura 21 Micrografías TEM para las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A), plata (B) y oro (C).....	57
Figura 22 Análisis UV-visible para las nanopartículas sintetizadas utilizando alginato su funcionalización para A) cobre, B) plata y C) oro. ....	59
Figura 23 Distribución del tamaño de partícula para las nanopartículas de A) cobre, D) plata y F) oro y para las nanopartículas funcionalizadas de B) cobre, E) plata y G) oro. ....	60
Figura 24 Potencial zeta para las nanopartículas funcionalizadas (rojo) y las no funcionalizadas (azul). ....	61
Figura 25 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU (A, B y C), 1000 PFU (D, E y F) y 2000 PFU (G, H e I) de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, D y G), plata (B, E y H) y oro (C, F e I). ....	63
Figura 26 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU (A, B y C), 1000 PFU (D, E y F) y 2000 PFU (G, H e I) de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, D y G), plata (B, E y H) y oro (C, F e I). ....	64
Figura 31 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia Salmonella enterica ser. Typhimurium (3 repeticiones). ....	66
Figura 32 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia Salmonella enterica ser. Typhimurium (3 repeticiones). ....	67

Figura 33 UV-vis análisis para evaluar la especificidad hacia el RSV por las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) en presencia de Salmonella enterica ser. Typhimurium (3 repeticiones).....	68
Figura 34 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia P. aeruginosa (3 repeticiones).....	70
Figura 35 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia P. aeruginosa (3 repeticiones).....	71
Figura 36 UV-vis análisis para evaluar la especificidad hacia el RSV por las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) en presencia de P. aeruginosa (3 repeticiones).....	72
Figura 37 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia Adenovirus (3 repeticiones). ....	74
Figura 38 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia P. aeruginosa (3 repeticiones).....	75
Figura 39 UV-vis análisis para evaluar la especificidad hacia el RSV por las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) en presencia de Adenovirus (3 repeticiones).....	76
Figura 40 Solución utilizada para los experimentos que contiene el RSV. ....	80

Figura 41 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para las nanopartículas funcionalizadas de oro a A) 30 min, B) 60 min y C) 120 min. El símbolo (*) representa la significancia a $p < 0.05$ .....	82
Figura 42 Estructura química del anticuerpo.....	88
Figura 43 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para A) cobre, B) plata y C) oro a 30 min. El símbolo (*) representa la significancia a $p < 0.05$ . ....	90
Figura 44 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para A) cobre, B) plata y C) oro a 60 min. El símbolo (*) representa la significancia a $p < 0.05$ .....	93
Figura 45 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para A) cobre, B) plata y C) oro a 120 min. El símbolo (*) representa la significancia a $p < 0.05$ . ....	94
Figure 46 Gráfico que representa las interacciones entre el valor logarítmico de la cantidad de RSV contra el desplazamiento promedio del LSPR para A) de cobre, B) plata y C) oro. Línea completa representa el experimento de nanopartículas funcionalizadas y la línea de punteada para las no funcionalizadas. ....	95
Figure 47 Esquema sobre los experimentos de reactividad cruzada y especificidad para A) cobre, B) plata y C) oro con <i>Salmonella enterica</i> ser. typhimurium. NP y NF representan los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas respectivamente y Bc para la bacteria. ....	98
Figura 48 Esquema sobre los experimentos de reactividad cruzada y especificidad para A) cobre, B) plata y C) oro con <i>P. aeruginosa</i> . NP y NF	

representan los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas respectivamente y Bc para la bacteria. ....	100
Figure 49 Esquema sobre los experimentos de reactividad cruzada y especificidad para A) cobre, B) plata y C) oro con Adenovirus. NP y NF representan los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas respectivamente y AD para el Adenovirus. ....	103
Figura 46 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas funcionalizadas de oro a 30 min (A, B y C) 60 min (D, E y F) y 120 min (G, H e I). ....	126
Figura 47 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas no funcionalizadas de oro a 30 min (A, B y C) 60 min (D, E y F) y 120 min (G, H e I). ....	127
Figura 48 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas. ....	128
Figura 49 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas (control) de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas. ....	129
Figura 50 Análisis UV-vis para la detección de 1000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas. ....	130
Figura 51 Análisis UV-vis para la detección de 1000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas (control) de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas. ....	131

Figura 52 Análisis UV-vis para la detección de 2000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.....	132
Figura 53 Análisis UV-vis para la detección de 2000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas (control) de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas. ....	133



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1 Clasificación de los anticuerpos.....	12
Tabla 2 Especificaciones de las variables consideradas en el diseño de experimentos. ....	37
<i>Tabla 3 Experimentos del diseño factorial 3<sup>2</sup></i> .....	38
Tabla 4 Valores de la R de Pearson a diferentes tiempos para los experimentos utilizando las nanopartículas funcionalizadas. ....	96
Tabla 5 Valores de LOD y LOQ para los experimentos con la mejor linealidad.	96

## NOMENCLATURA

RSV Virus respiratorio sincitial (*Respiratory syncytial virus*)

Ab Anticuerpo

AD *Adenovirus*

Ag Plata

Au Oro

Bc Bacteria

BCA *Bicinchoninic acid assay*

CFU Unidades formadoras de colonias

Cu Cobre

DFA *Direct florescent-antibody*

ADN Ácido desoxirribonucleico

EDC 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbamida

FTIR Infrarrojo por transformada de Fourier

HCP Empaquetamiento hexagonal

VIH-1 Virus de inmunodeficiencia humana

LOD Límite de detección

LOQ Límite de cuantificación

LSP Plasmón superficial localizado

LSPR Resonancia plasmónica superficial localizada

MW Microondas

NF Nanopartículas funcionalizadas

NHS N-Hidroxisuccinamida

NP    Nanopartículas no funcionalizadas

Np's   Nanopartículas

NSL   Litografía por nanoesféras

PCR   Reacción polimerasa en cadena

PFU   Unidades formadoras de placas

QD's   *Quantum dots*

RSV   Virus respiratorio sincitial

SERS *Surface-enhanced Raman spectroscopy*

SPR   Resonancia plasmónicas superficial

TEM   Microscopía electrónica de transmisión

UV-vis Ultravioleta-visible

FESEM    Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo

EDS   Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Introducción a la Nanobiotecnología**

La nanobiotecnología describe las aplicaciones de las técnicas nanotecnológicas para el desarrollo y aplicación de productos y procesos biotecnológicos, incluyendo la manipulación de estructuras pequeñas (químicas y biológicas) con tamaños menores a 100 nm para el desarrollo de métodos más sensitivos y exactos [1], en otras palabras, esta ciencia trata de crear nuevas estructuras, comprensión de nuevas propiedades y de la organización de estas nuevas estructuras en productos y/o dispositivos complejos más grandes.

Los estudios multidisciplinarios y más importantes que conciernen a la nanotecnología son la química, la física y la biología (entre otros) [2]. En química, esta ciencia se asocia a los procesos de síntesis de muchos compuestos tales como nanopartículas, coloides, micelas y moléculas de polímeros; se complementa con la física, donde se estudian las nanoestructuras además de relacionar los conceptos de electrones, fotones y energía. En biología, se tiene un interés en nanoestructuras como componentes de la célula y otros microorganismos como ADN y virus [3]. El papel de estas 3 ciencias y su

integración en la nanotecnología ofrece enormes aplicaciones interdisciplinarias como detección [4, 5], sensado [6, 7], focalización [8, 9], liberación de fármacos [10, 11] y tratamientos de enfermedades [12, 13] por nombrar algunos.

Las nanopartículas metálicas han sido objeto de investigación debido a sus propiedades y aplicaciones características en las ciencias biomédicas y de la ingeniería, además de su interés para su uso en la nanotecnología. Estas nanopartículas tales como oro, plata y cobre difieren de los materiales a granel debido a la respuesta óptica de la excitación del plasmón superficial localizado (LSP). El LSP (Figura 1) son oscilaciones coherentes de electrones de conducción en la superficie excitada de un metal debido a la interacción con la radiación electromagnética.

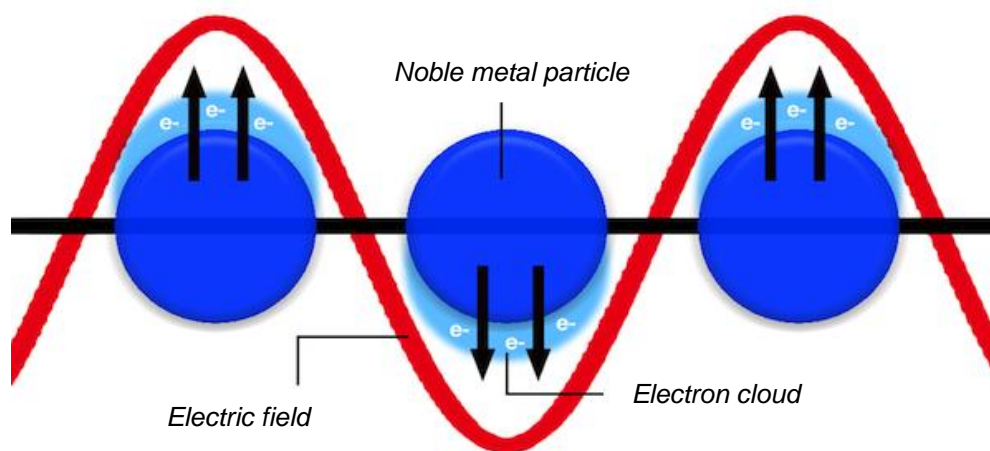


Figura 1 Interacción entre la energía (luz) y la nanopartícula metálica [14].

Estas oscilaciones proporcionan una banda de extinción en el intervalo del espectro infrarrojo, visible y ultravioleta. La posición espectral (longitud de onda) de estos fenómenos es muy sensible al tipo de metal, tamaño, forma y el campo dieléctrico que le rodea [15].

Este campo de investigación es conocido como “plasmonicos” [16-18] y ha sido sujeto a investigación debido a las potenciales aplicaciones en pequeños dispositivos como sensores, circuitos fotónicos y también en el diagnóstico médico y de terapia [19-23].

Existen ciertas formas de sintetizar nanopartículas metálicas, los métodos más característicos para la síntesis son la litografía nanoesferas (NL) [24], litografía por haz de electrones [25] y síntesis química en medios líquidos [26].

La técnica por litografía de nanoesferas (NSL) (litografía coloidal [27, 28]) es un método para la producción de nanopartículas en matrices regulares y homogéneas en diferentes tamaños. Combina las ventajas de los enfoques químicos del “*top-down*” y “*bottom-up*”.

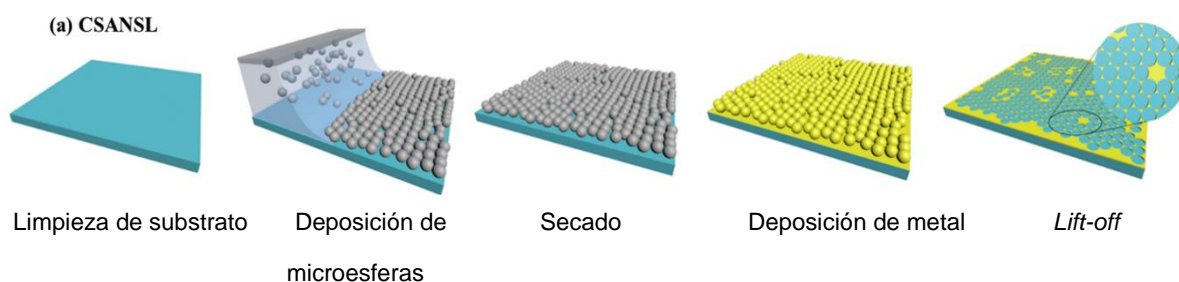


Figura 2 Proceso de la técnica de litografía de nanoesferas

En general, un sustrato se recubre con una suspensión de nanopartículas esféricas, después se proporciona un tratamiento químico para mejorar su propiedad hidrófila para luego tener un proceso de secado. Entonces, esta plantilla se utiliza para seleccionar un patrón debido a la deposición del material a través de los espacios de los granos ordenados. Después de este proceso, la plantilla se elimina por sonicación o mediante la eliminación de la superficie del sustrato. A veces es necesario un recocido para cristalizar el material con el fin de inducir un cambio de fase de la muestra.

La técnica de litografía por haz de electrones (EBL) es otra técnica de nanofabricación, no sólo permite una deposición directa de estructuras de hasta 10 nm, sino que también permite una deposición a nanoescala con un patrón, como la litografía óptica y litografía de nano-impresión a través de la formación de máscaras y plantillas [29].

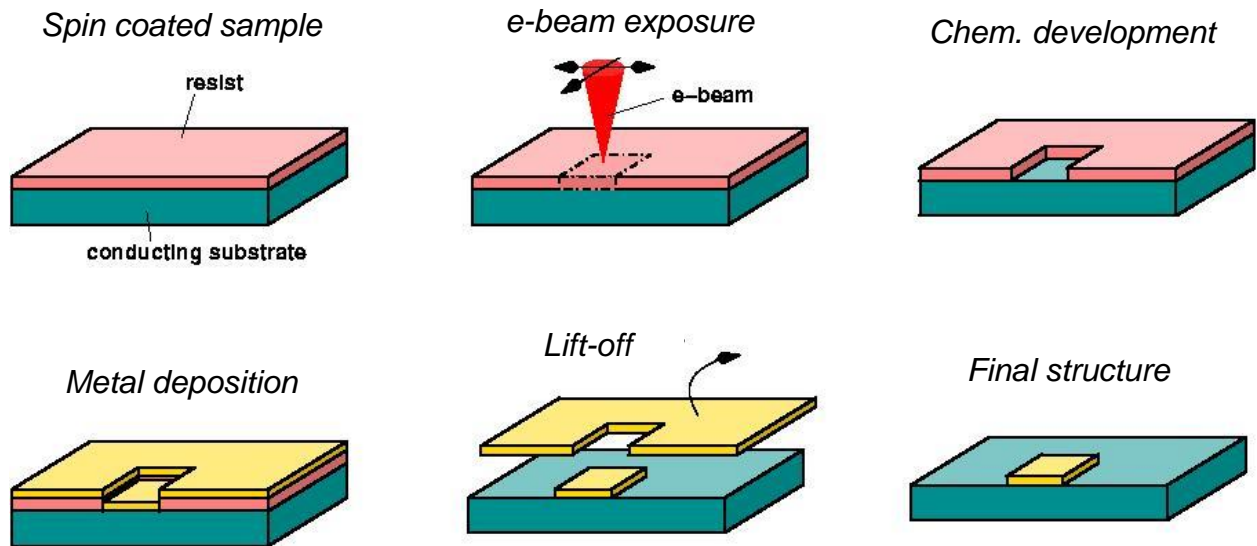


Figura 3 Proceso de la técnica por EBL

El proceso para la técnica de EBL implica la exposición de un material por un haz de electrones altamente enfocado para modificar la superficie del material en que se puede formar una plantilla para diversas aplicaciones.

Las técnicas NLS y EBL utilizan procesos para definir la geometría de las nanopartículas, las nanopartículas se colocan en un sustrato mediante el uso de una deposición al vacío. El resultado de este proceso puede permitir la formación de una estructura policristalina del metal, en contraste con las partículas de una sola fase cristalina fabricadas por síntesis química. Las principales desventajas de estos métodos son la restricción de la morfología de las nanopartículas, un bajo rendimiento y altos costos de inversión para el método EBL.

Las nanopartículas metálicas se han fabricado utilizando diferentes rutas de síntesis químicas en condiciones específicas. Durante los procesos de precipitación, reducción o la formación de nanopartículas en fases líquidas, se añaden agentes de control de superficie. Éstos interfieren con la partícula de nucleación y de crecimiento para evitar la aglomeración y podrían permitir un control de tamaño para las nanopartículas. La síntesis química en medios líquidos es un método con múltiples ventajas como el bajo costo y la simplicidad de síntesis con una fase cristalina homogénea.

La síntesis de nanopartículas con formas y tamaños controlados se ha desarrollado ampliamente por un método llamado reducción química. Este método se caracteriza por su rápido progreso en los últimos años con síntesis de morfologías de esferas [30], barras [31], prismas [32, 33], cubos [34, 35], discos [36, 37], entre otras [38]. Esta combinación de formas y tamaños proporcionan una respuesta diferente en sus propiedades ópticas, las cuales pueden ser utilizadas en diferentes aplicaciones, dependiendo del requisito o campo de estudio.

Muchas de estas síntesis se llevan a cabo utilizando agentes reductores como el borohidruro de sodio [39, 40], hidracina [41], N,N-dimetilformamida [42], entre otros compuestos orgánicos [43-45] proveyendo la obtención de nanopartículas con alta reactividad, sin embargo; muchos de estos compuestos están relacionados a la toxicidad y riesgos biológicos [46]. De la misma manera, los agentes estabilizadores usados para la síntesis de nanopartículas incluyen moléculas orgánicas como trifenilfosfina [47], alcohol polivinílico [48] y la polivinilpirrolidona [49], las cuales son tóxicas y son difíciles de disponer ambientalmente [50].



Recientemente, algunos polímeros naturales y compuestos orgánicos como el quitosan [51], almidón [52, 53], polipéptidos [54], heparina [55] y el hialurón [56] han sido utilizados para la síntesis verde de nanopartículas. Algunos de estos compuestos tienen un rol dual de función tanto para la reducción como la estabilización de nanopartículas metálicas, permitiendo una síntesis de un solo paso [57].

#### 1.1.1 Aplicaciones

La resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR) es la respuesta óptica a la excitación por un campo electromagnético característica de las nanopartículas metálicas, que ofrece diversas aplicaciones.

La posición en el espectro para el LSPR puede ser alterado dependiendo de la constante dieléctrica que rodea las nanopartículas metálicas. Esta alteración se puede observar como un cambio o desplazamiento azul-rojo para el pico de absorción del LSPR, y puede ser una herramienta útil para aplicaciones de detección [58].

Sin embargo, si la interacción entre estos sistemas proporciona un gran cambio, la concentración de algunos analitos puede estar relacionada con el cambio de color de las nanopartículas.

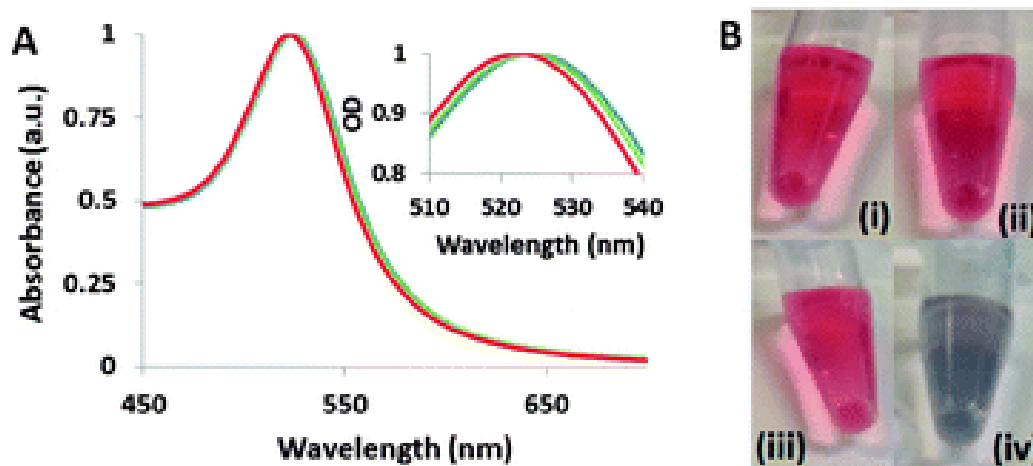


Figura 4 Nanopartículas de oro y sus respectivos espectros UV-vis antes (rojo) y después (verde) de la funcionalización (A) y nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN (B)[59].

Las aplicaciones de detección que implican el uso de los LSPR, requieren mejoras en la interacción de las nanopartículas metálicas. Estas mejoras desarrollan nuevas áreas para la detección con una sensibilidad extraordinaria, con bajo nivel de concentración necesario para la detección [60]. Entre los analitos estudiados utilizando LSPR se encuentran los iones metálicos [61], toxinas [62], glucosa [63], ácidos nucleicos [64], moléculas [65] e interacciones antígeno-anticuerpo [66, 67].

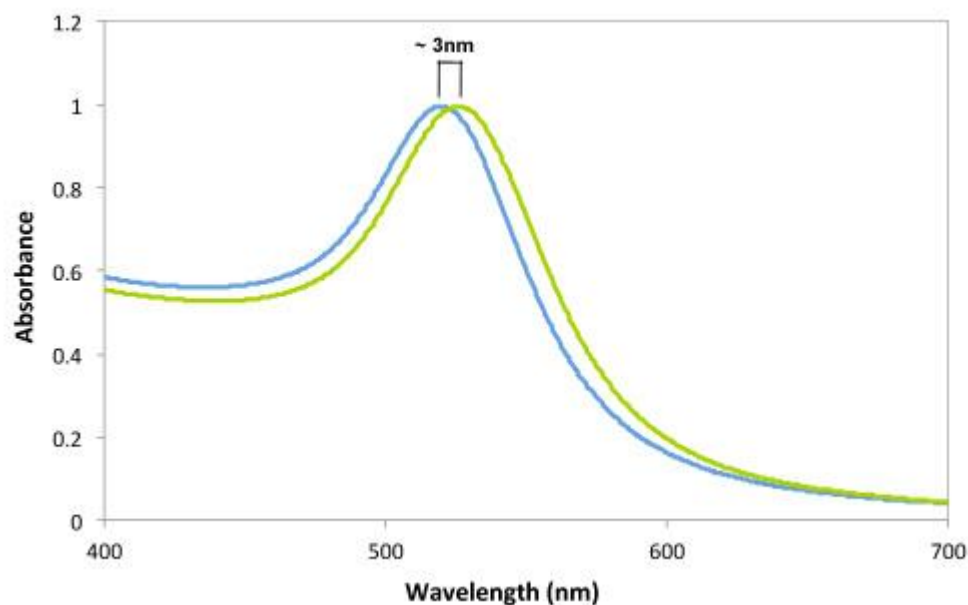
### 1.1.2 Biosensado

Existen algunas aplicaciones en biosensores utilizando los LSPR, una de ellas es la detección de pequeñas biomoléculas, éstas pueden ser ácidos nucleicos, enzimas, antígenos y anticuerpos. Estas biomoléculas tienen tamaños similares a las nanopartículas, donde la posible interacción entre las moléculas y las nanopartículas es compatible estructuralmente hablando. Esta compatibilidad significa que la combinación entre las nanopartículas y las biomoléculas proporcionar una amplia selección de bioreceptores que podrían utilizarse para desarrollar diferentes tipos de funcionalización

[68]. La funcionalización se puede utilizar no sólo en biosensores, sino también para aplicaciones biomédicas como de formación de imágenes, diagnóstico y terapia [69].

Existen dos métodos utilizados para biodetección, la resonancia de plasmónica superficial (SPR) y la espectroscopía por LSPR. La espectroscopía de SPR es una técnica que detecta el índice de refracción (RI) del medio cerca de una superficie de metal noble mediante la medición de los parámetros de luz (ángulo y longitud de onda) [70]; esto permite una excitación de los plasmones de superficie. Esta técnica ha detectado analitos traza incluso a un rango femtomolar [71]. Sin embargo, el costo de esta técnica es más alto en comparación con LSPR.

La espectroscopía por LSPR ofrece una aplicación de detección fácil y permite la fabricación de dispositivos de bajo costo en mantenimiento comparado con la técnica de SPR. En algunos casos, esta técnica demuestra capacidades comparables con otras técnicas tales como la misma SPR y la espectroscopía Raman. Los sensores LSPR se componen de nanopartículas de metales nobles (como Au, Ag y Cu), que pueden ser funcionalizadas para proveer un intervalo óptimo y una amplia gama de aplicaciones para la detección.



*Figure 5 Desplazamiento del LSPR cuando se añade ADN a las nanopartículas esféricas de oro [72].*

El método más común para la detección utilizando la propiedad de los LSPR, es la medición del desplazamiento de la longitud de onda (Figura 5), en la que se puede observar el cambio en el máximo de la absorción LSPR como una función del cambio en el entorno dieléctrico causado por adsorción analito [73]. Esta técnica ha sido utilizada para la detección de péptidos [74], ADN [75], bio-marcadores de enfermedades [76] y proteínas [77].

### 1.1.3 Bio-funcionalización de nanopartículas

El primer paso para utilizar un biosensor es la formación de conjugados nanoestructura-biomolécula. Esto significa que se tiene que proceder a un bio-funcionalización. Este proceso se puede definir como una modificación de la superficie

de la nanopartícula con productos biológicos tales como proteínas, ligandos, anticuerpos, enzimas, etc.

La bio-funcionalización de nanopartículas es fácil; sin embargo, requiere una optimización cuidadosa seguida de caracterización. Es necesario estudiar el tamaño, área superficial, estabilidad coloidal, la densidad y el tipo de grupos reactivos que se desean para cada procedimiento estándar. Además, las biomoléculas a conjugarse en la superficie de las nanopartículas necesitan tener algunos requisitos como un tamaño diferente, composición química y la ubicación del sitio activo biológico [78]. Algunos ejemplos se discutirán adelante.

Hay 3 tipos de biomoléculas ampliamente utilizadas para bio-funcionalizar una nanopartícula, estas son:

- La funcionalización de las nanopartículas con biomoléculas de bajo peso molecular
- Funcionalización con ácidos nucleicos
- Funcionalización con anticuerpos

#### 1.1.4 Funcionalización con biomoléculas de bajo peso molecular

Los carbohidratos se han utilizado para la bio-funcionalización de las nanopartículas debido a la amplia gama de opciones presentes en la familia de estas moléculas. El bajo costo y la fácil funcionalización de las nanopartículas son las mayores ventajas para sus aplicaciones biológicas.

Uno de los factores más importantes que se debe tener en cuenta para la funcionalización es la densidad de moléculas en la superficie de las nanopartículas, dado que esto puede afectar en el reconocimiento molecular del sistema.

Se ha informado de que una baja densidad de estas moléculas puede contribuir a interacciones biológicas no específicas de las nanopartículas. Esto es suficiente para inhibir la adsorción de proteínas, debido al impedimento estérico, pero no para prevenir la interacción entre moléculas pequeñas y otro tipo de proteínas [79]. Esto demuestra la poca especificidad de los carbohidratos, y no pueden ser útiles para ciertos tipos de aplicaciones biológicas como el biosensado.

#### 1.1.5 Funcionalización con ácidos nucleicos

La funcionalización con ácidos nucleicos se ha utilizado para aplicaciones como sensores [80], liberación de fármacos [81] y sistemas de imagen [82]. El ADN ha sido mayormente utilizado para la funcionalización de las nanopartículas debido a las propiedades de auto-ensamblaje y el reconocimiento de bases complementarias.

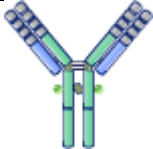
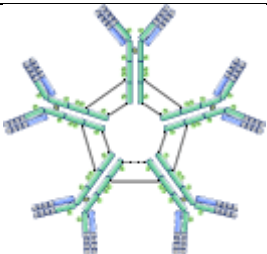

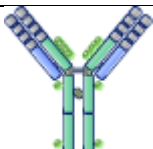
El proceso de vinculación de ADN puede ser covalente o no covalente; sin embargo, un método desarrollado y estudiado es necesario para funcionalización, considerando el tipo de nanomaterial y aplicación que se desean utilizar.

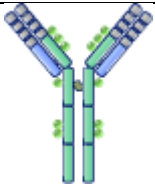
### 1.1.6 Funcionalización con anticuerpos

La funcionalización de nanopartículas usando anticuerpos (Ab) ha sido un proceso para el desarrollo de sistemas de ensayo que se pueden utilizar en los biosensores y los estudios de anticuerpos dirigidos a los sistemas celulares.

Hay 5 tipos de anticuerpos, los IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (Tabla 1), que se clasifican según el tipo de región de la cadena pesada y de la función a realizar diferentes partes del cuerpo.

Tabla 1 Clasificación de los anticuerpos

<b>IgG</b>	IgG es el anticuerpo principal en sangre y es ampliamente distribuido a la sangre y los tejidos; protege el cuerpo.	
<b>IgM</b>	IgM se compone de 5 anticuerpos, tiene un papel clave en el sistema inmune inicial. Se distribuye a la sangre.	
<b>IgA</b>	IgA se compone de 2 anticuerpos. Se distribuye al suero, secreciones nasales, saliva, la leche materna y al líquido intestinal.	
<b>IgD</b>	IgD está presente en la superficie de las células B y desempeña un papel en la	

	inducción de la producción de anticuerpos.	
<b>IgE</b>	Se cree que el IgE está relacionado con reacciones de inmunidad a los parásitos, y se ha catalogado recientemente como un factor clave de las alergias tales como polinosis.	

Entre estas clases de anticuerpos, la inmunoglobulina G (IgG) es ampliamente utilizada para la biofuncionalización. La unidad de IgG consta de dos cadenas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas entre sí por un enlace no covalente, y enlaces disulfuro. Las últimas cuatro cadenas de proteínas interactúan en una geometría en forma de Y y tiene dos sitios de unión idéntico al antígeno en el extremo de las cadenas de la estructura de Y.

Las posiciones de los sitios de unión al antígeno indican la orientación del Ab sobre la superficie de las nanopartículas. Esta orientación afecta a la unión del antígeno debido a las cuatro posibles orientaciones en la conjugación en la superficie de una nanopartícula dado que algunas no permitirían dicha unión (Figura 6) [78].



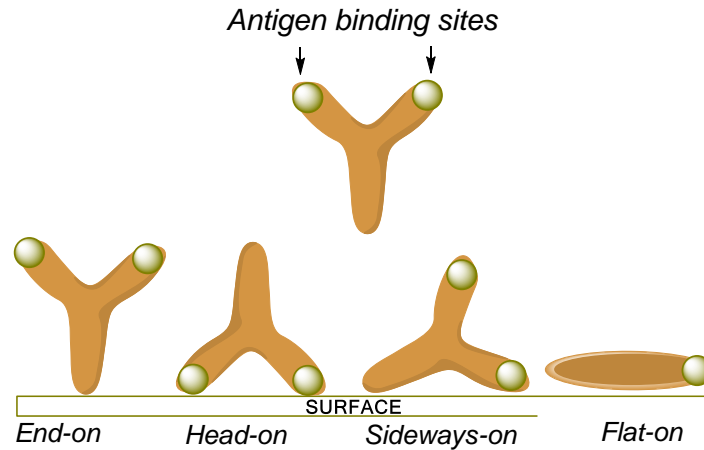


Figura 6 Esquema que muestra la interacción entre un anticuerpo y una superficie específica.

Un anticuerpo que interactúan en una interacción “De fin” (*End-on*) es la manera eficaz para unirse con un antígeno. Recientemente, las mejoras en los protocolos permiten ésta interacción con la superficie de la nanopartícula para maximizar la interacción. Sin embargo, un protocolo no es útil para todos los experimentos con nanopartículas, esto se debe principalmente a los factores físicos como el pH, dado juegan un papel importante en este tipo funcionalización debido al hecho de que si el pH disminuye existe una mejor eficiencia en la funcionalización del Ab con una interacción “*End-on*”, pero la acidez afecta a casi todos los nano-sistemas basados en nanopartículas metálicas y podrían destruir dichas nanopartículas.

#### 1.1.7 Métodos de acoplamiento

La funcionalización con biomoléculas se puede realizar de dos formas:

- a) Absorción pasiva
- b) El acoplamiento covalente a través de un agente de entrecruzamiento

La absorción pasiva de las biomoléculas a las nanopartículas no es un procedimiento predilecto para la conjugación de nanopartículas, ya que no proporciona una fijación permanente y las moléculas pueden tener un proceso de desorción de la superficie a medida que avanza el tiempo. Por otro lado, el acoplamiento covalente inmoviliza moléculas a nanopartículas permanentemente (por ejemplo, por medio de grupos carboxilo o amina). Por lo tanto, proporciona una mayor estabilidad del recubrimiento en comparación con el método de absorción pasiva, además de ser más específico y controlable.

Este método utiliza enlazadores químicos que pueden reaccionar con algunos grupos en las moléculas. El proceso de acoplamiento covalente es también una manera útil para mantener la estructura de la proteína intacta y minimiza las propiedades adversas después de la conjugación.

Existen muchos enlazadores químicos disponibles para diferentes tipos de acoplamiento covalente, sin embargo, la química del 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbamida/N-hidroxisuccinamida (EDC/NHS) es uno de los procedimientos más utilizados para llevar a cabo el proceso de funcionalización.

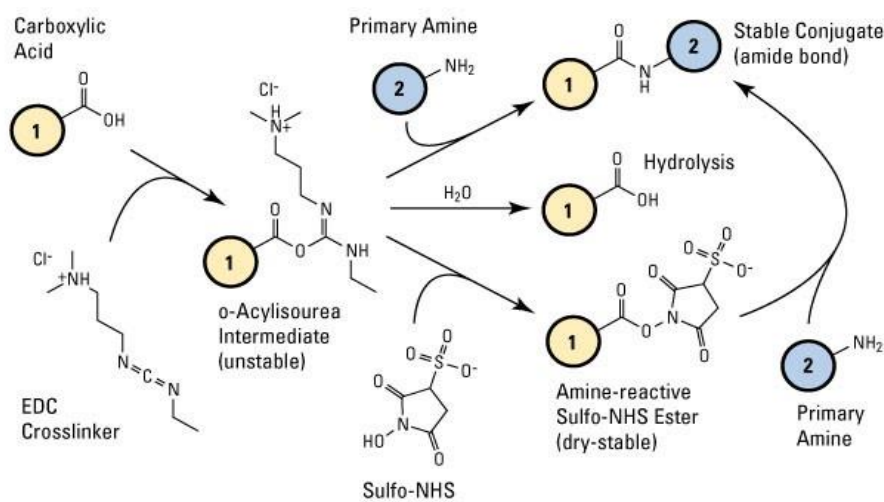


Figura 7 Esquema que muestra la química de acoplamiento del EDC-NHS [83].

En este procedimiento el EDC reacciona con los grupos de ácido carboxílico, produciendo una especie intermedia llamada *o*-acilisourea, posteriormente una amina primaria se une a un grupo amida, para formar un compuesto estable en soluciones acuosas. Sin embargo, en algunos casos, la N-hidroxisuccinimida (NHS) o su compuesto soluble en agua (sulfo-NHS) se incluye en los métodos de acoplamiento EDC para mejorar la eficiencia o para la fabricación de un producto intermedio estable. La formación del compuesto entre el EDC y el NHS a grupos carboxilo, producen un éster de NHS que es más estable que el compuesto *o*-acilisourea (Figura 7).

#### 1.1.8 Detección del RSV

El virus respiratorio sincitial (RSV) es un paramixovirus que conduce a síntomas leves, parecidos al resfriado en adultos y niños. Puede ser más grave en los bebés pequeños o adultos mayores. En el mundo, la infección por RSV se estima en 64 millones de casos y 160.000 muertes al año [84]; En EE.UU., los bebés muestran una tasa de mortalidad por RSV inclusive mayor que la de la gripe común [85]. Sin embargo, en México no hay información sobre los casos o los costos involucrados en el tratamiento de RSV [86], y su impacto en las instituciones de salud y la sociedad es desconocida. Este problema común en los países en desarrollo se asocia con el costo, efectividad, facilidad y rapidez de algunas técnicas para la detección VSR.

La detección del VSR incluye algunas de las técnicas que se han desarrollado para el diagnóstico de virus; Entre las técnicas más comunes son ELISA, PCR y PCR en tiempo real.

La técnica de ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA) es la técnica utilizada para la detección colorimétrica de las interacciones proteína-anticuerpo. Sus pequeños límites de detección en diversas mediciones, han hecho que sea una técnica útil en el diagnóstico clínico de rutina para diversos patógenos. La detección de RSV utilizando ELISA se basa en la interacción con la proteína F del virus (antígeno) [87].

La técnica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida y sensible para la detección de patógenos [88]. Este método se basa en la transcripción inversa de PCR; se trata de un procedimiento de dos días de duración con una sensibilidad del 73%. Sin embargo, este método es más rápido en comparación con el método de cultivo, que generalmente toma de 3-5 días para realizarse [88].

Uno de los métodos más sensibles para la detección y el diagnóstico de patógenos es la PCR en tiempo real (RT-PCR). Varios estudios se han llevado a cabo para el desarrollo de ensayos de PCR en tiempo real para la detección de RSV. Estos estudios desarrollados utilizando RT-PCR han sido rápidos, sensibles y específicos. El método del TaqMan basado en la técnica RT-PCR para la detección de las cepas de R [89], es sensible incluso a 0.023 UFP y se tarda 6 horas para hacer una detección exitosa.

Como se explicó anteriormente, la ejecución y el costo de estos desarrollos clínicos requieren un extenso estudio y tiempo. La nanobiotecnología se ha convertido en una ciencia potencial para encontrar los métodos nuevos, fáciles y más rápidos para el diagnóstico y la detección de patógenos, incluyendo el RSV. Los estudios más desarrollados en esta área son el ensayo directo de anticuerpos fluorescentes (DFA), la

microscopía de inmunofluorescencia utilizando puntos cuánticos (QD's) y la espectroscopia Raman (SERS).

El método directo de anticuerpo fluorescente detecta la presencia de un antígeno particular. En este método los productos químicos fluorescentes se unen a la región de un anticuerpo. Si el antígeno está presente, el anticuerpo se une para generar una interacción muy específica y sensible. Sin embargo, las desventajas e inconsistencias del DFA se pueden atribuir a la decoloración de los colorantes, la conjugación de anticuerpos con colorantes y la excitación a dos longitudes de onda diferentes [90, 91].

Para resolver las desventajas de la técnica de DFA, se ha desarrollado la microscopía de inmuno fluorescencia usando puntos cuánticos (QD's) siendo un candidato prometedor para el diagnóstico clínico. Esto es porque los de QD's son foto-estables en comparación con las biomoléculas utilizadas en DFA. Esto significa que los QD's no pierden fluorescencia en una larga exposición a la energía. Por otra parte, se puede utilizar para técnicas de multiplexado, ya que pueden ser excitados en la misma longitud de onda [92]. El virus RSV se ha estudiado mediante este método, en particular la progresión de la infección, y se encontró que este método era más sensible que otras técnicas como la RT-PCR [93].

La espectroscopia de superficie Raman (SERS) es una técnica espectroscópica Raman que proporciona una señal mejorada de moléculas activas que han sido adsorbidos en superficies metálicas. Debido a las propiedades de rapidez, sensibilidad, especificidad y no destructividad de este método, se utiliza para ciertos bioanálisis [94, 95]. Una de las

propiedades importantes sobre el análisis por SERS es que esta técnica puede identificar entre varios tipos de virus como el Adenovirus, Rinovirus, Rotavirus [96], y el RSV [97]. La buena sensibilidad para la detección del RSV por SERS (que puede diferenciar entre las distintas cepas de RSV) ha llevado a utilizar esta técnica para el análisis clínico [97].

#### 1.1.9 Propósito del estudio

El presente estudio se centra en la funcionalización de nanopartículas metálicas de cobre, plata y oro para la detección del RSV. Estas nanopartículas se pueden sintetizar utilizando alginato y L-cisteína como agentes reductores y estabilizadores bajo irradiación con microondas, siendo un método verde de síntesis. Los anticuerpos policlonales se utilizarán como moléculas de funcionalización mediante el protocolo EDC. Las nanopartículas metálicas interactuarán con el virus RSV, y variando la concentración del virus se encontrará una respuesta entre la cantidad de RSV y el desplazamiento del LSPR para cada nanopartícula. La interacción se midió utilizando espectroscopia UV-vis donde observaremos un cambio en la longitud de onda máxima característica del LSPR para las nanopartículas de cobre, plata y oro. La Figura 8 resume el principio de este trabajo.

## Síntesis de nanopartículas y funcionalización

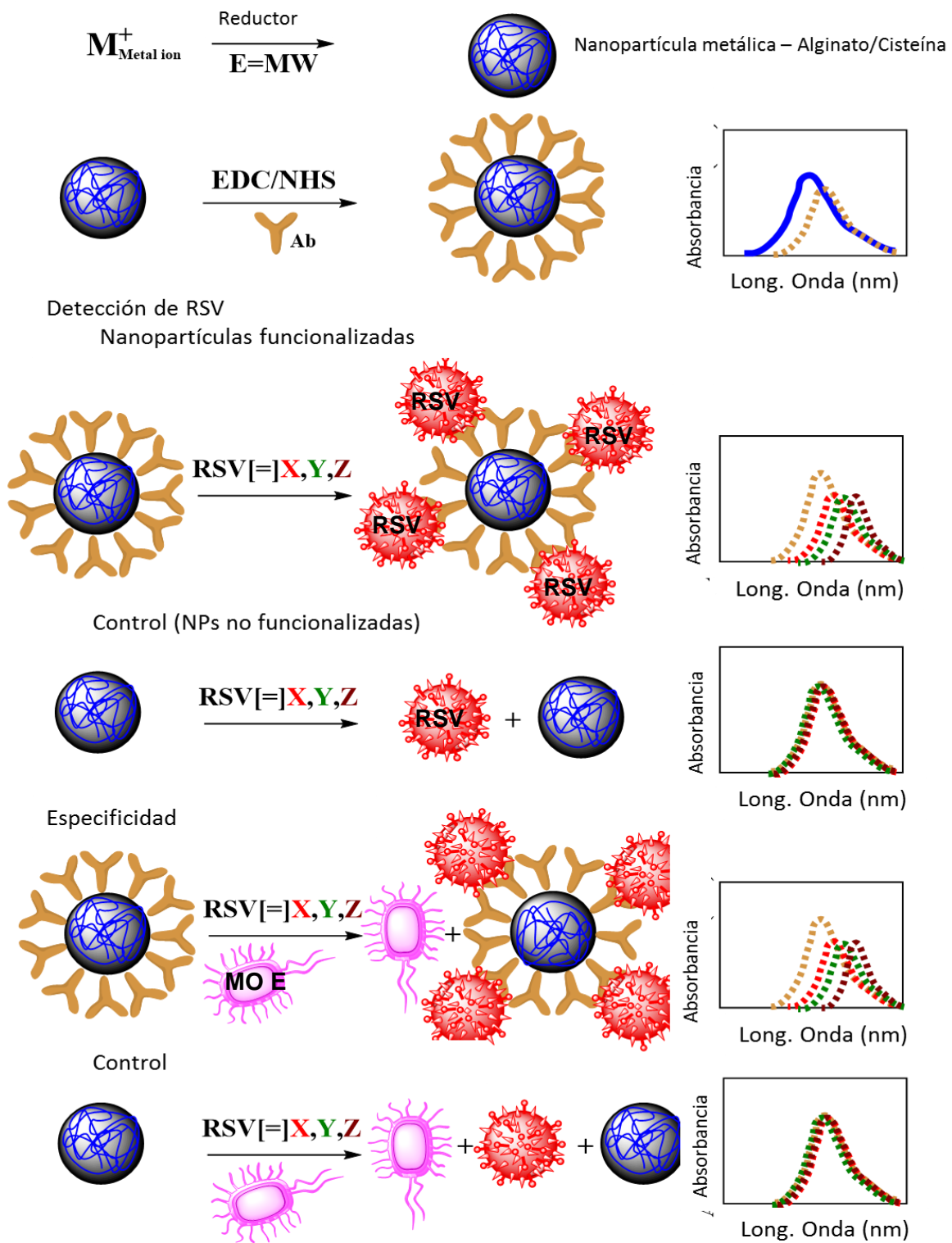


Figura 8 Esquema para todas las interacciones previstas y sus respectivos análisis UV-vis, el microorganismo externo para los experimentos de especificidad se representa como *MO. E.*

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

Las nanopartículas metálicas han desempeñado un papel central en la revolución tecnológica que está empujando más allá de las tradicionales caracterizaciones ópticas y plenamente más allá del estudio del tamaño nanométrico [1, 2]. Las propiedades ópticas de los metales nobles como el oro y la plata se rigen principalmente por las oscilaciones coherentes de la banda de electrones de conducción sobre la superficie metálica excitada, este fenómeno es conocido como LSPR [3, 4].

Los metales nobles como el oro, la plata y el cobre han sido estudiados debido a esta propiedad [98]. Una de las aplicaciones más utilizadas de los LSPR se basa en los cambios del LSPR causados por el cambio dieléctrico del sistema entre las nanopartículas y otro producto. Este evento puede detectarse utilizando los cambios de longitud de onda característico de los LSPR de las nanopartículas [99].

El estudio del ambiente dieléctrico de la respuesta del LSPR puede ser utilizando la técnica de UV-vis [32, 100], sin embargo, es necesario sintetizar nanopartículas con un tamaño y morfología homogénea para tener una respuesta idónea del LSPR [32].

Actualmente, muchos métodos se han reportado para la síntesis de nanopartículas metálicas mediante el uso de rutas químicas, físicas, fotoquímicas y rutas biológicas. Cada método tiene sus ventajas y desventajas teniendo problemas comunes como los



costes, escalabilidad, tamaños de partículas y distribución de tamaños. Entre los métodos existentes, los métodos químicos con base en la reducción de especies iónicas se han utilizado sobre todo para la producción de nanopartículas metálicas. Este análisis de literatura se limita a la síntesis de nanopartículas de Au, Ag, Cu y su aplicación para la detección de RSV.

## **2.1 Síntesis de nanopartículas metálicas**

Como se mencionó anteriormente, la síntesis química, específicamente el método basado en reducción, se ha utilizado y desarrollado para la síntesis de nanopartículas de metales nobles tales como Au, Ag y Cu. El uso de este método para la síntesis de nanopartículas de oro ha sido desarrollado utilizando citrato de sodio como un agente reductor (y su posterior uso como agente estabilizador) y ha sido objeto de estudio durante varios años [101, 102]. Siguiendo este procedimiento, la solución se calienta a 100 °C y se mezcla con el agente reductor. Este método proporciona una manera fácil y barata para sintetizar nanopartículas de oro. De la misma manera, las nanopartículas de plata se han sintetizado usando citrato de sodio como agente reductor; el uso del mismo agente es debido al potencial de reducción similar al oro que permite el uso de agentes similares.

Sin embargo, el uso de citrato de sodio como agente estabilizante no proporciona una estabilización adecuada para preservar las nanopartículas, en comparación con otros productos químicos tales como los basados en tiol [103], polivinilpirrolidona [104] y el alcohol polivinílico [105].

Estos precursores son estables incluso en medios biológicos [106] por largos periodos de tiempo comparado con el método basado en el uso de citrato. Sin embargo, el uso de estos agentes reductores y estabilizantes representan una forma tóxica para la síntesis de nanopartículas metálicas, para resolver ese problema, el uso de moléculas "verdes" tales como almidón [107], quitosano y azúcares [108] han ganado el interés de los investigadores en los últimos años debido a su forma simplista y verde para sintetizar nanopartículas. El alginato se ha utilizado como un agente reductor y estabilizador para las nanopartículas de Au [109, 110] y Ag [111];excepto para las nanopartículas de Cu, donde no se han sintetizado utilizando estos precursores.

En el 2014, Zhanfang *et al.* [112] reportan un método sencillo para la síntesis en una sola etapa de nanopartículas de oro cubiertas de cistina en solución acuosa a temperatura ambiente; en esta investigación se utilizó la L-cisteína como agente reductor, la cual experimentó un proceso de dimerización (cistina) debido a la unión de los átomos de azufre y fue la responsable de recubrir a las nanopartículas de oro, estabilizándolas, teniendo enlaces débiles entre el par de electrones del grupo amino y la superficie metálica del oro. Además, observaron la influencia del pH sobre la reacción, a medida que se aumenta el pH, el potencial de reducción de la cisteína aumenta debido a la disminución de la actividad del ion hidrógeno.

En esta investigación se incluye entre sus variables al pH, sin embargo, esta variable puede ser establecida con un valor fijo. La importancia de esta variable se basa en aumentar el poder de reducción de las moléculas orgánicas. Los grupos funcionales de estas moléculas, (tioles para el caso de la L-cisteína y carboxilo para otras moléculas como el alginato) son grupos reductores en condiciones básicas [113], por lo tanto tener

un pH alto ayuda a aumentar la reducción de los iones metálicos aunque se debe de tener en cuenta el pH en el cual existe la formación de hidróxidos metálicos en el sistema.

Khan *et al.* en el 2012 [114] reportan la síntesis de nanopartículas de plata recubiertas de cisteína. Ellos utilizaron a la L-cisteína como agente reductor y estabilizante. La caracterización por UV-visible demostró la banda de absorción característica del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, en el análisis por FTIR se demuestra la aparición de bandas características de los grupos carboxilo y amino de la molécula, siendo evidente la desaparición de la banda del grupo tiol, esto debido a la formación de enlaces azufre-metal (R-S-Ag) los cuales proveen una gran estabilidad a las nanopartículas siendo demostrada por el nulo cambio en la banda de absorción del plasmón superficial observado a 5 días después de la síntesis. Esto contradice a lo observado por Zhanfang *et al.* en los cuales reportan que la estabilización de las nanopartículas metálicas se deben a uniones electrostáticas de los pares de electrones del grupo amino y la superficie de la nanopartícula, si bien esto es posible, una explicación a este fenómeno es la cantidad de L-cisteína que exista en el sistema, una cantidad estequiométrica favorecerá la formación cargas electrostáticas entre la molécula oxidada de la cisteína (cistina) y la superficie metálica de la nanopartícula, en cambio una mayor concentración de cisteína favorecerá la consecuente reacción entre los grupos tiol de la molécula L-cisteína remanente entre la superficie metálica de la nanopartícula.

La química de síntesis de las nanopartículas de cobre es diferente que la plata y el oro; un alto potencial de reducción de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  (en comparación con  $\text{Ag}^+$  y los iones  $\text{Au}^{3+}$ ) y su pobre estabilidad química elemental como el estado hace que sea un proceso difícil de sintetizar estas nanopartículas. Es necesario el uso de agentes reductores

fuertes, como el borohidruro de sodio [115] y la hidrazina [116] y también agentes estabilizantes como la polivinilpirrolidona [117], ácido ascórbico [118] y alcohol polivinílico [119]. También la fácil oxidación de estas nanopartículas aumenta el reto de su síntesis. Dung *et al.* [120] en el 2011 reportan la comparación entre las síntesis de nanopartículas de Cu en dos solventes diferentes: agua y etilenglicol. Utilizaron NaBH<sub>4</sub> como agente reductor y a la molécula polivinilpirrolidona como agente estabilizante; Debido a la fácil oxidación de las nanopartículas de cobre añadieron al sistema ácido ascórbico como agente antioxidante. Ellos observaron por la técnica de UV-visible el aumento en absorbancia del plasmón característico de las nanopartículas de cobre en solvente agua estando a un mayor tiempo de reacción, para el caso donde se utilizó solvente al etilenglicol el plasmón aumentaba pocas unidades de absorbancia. Al momento de comparar la estabilidad de las nanopartículas se encontró que las nanopartículas en solvente de etilenglicol eran estables a 22 días, demostrado por la poca disminución en absorbancia del plasmón superficial, en el mientras que en el solvente agua a los pocos días de reacción el plasmón disminuía drásticamente. Debido a que las nanopartículas de cobre pueden ser rápidamente oxidadas, el uso del etilenglicol como solvente puede proveer una mayor protección ante la oxidación de las mismas.

## **2.2. Método asistido por microondas**

Los procesos convencionales de las síntesis de nanopartículas metálicas son demasiado lentas para satisfacer la demanda de nuevos métodos que generen los compuestos de una forma más rápida. A pesar de que se desarrollan métodos de química que combina otros procesos y de métodos automatizados para lograr la demanda, la mayoría de estas técnicas generan desechos químicos. Ahora, los

científicos han desarrollado nuevos métodos que pueden satisfacer los requisitos como métodos rápidos y benignos con el medio ambiente.

Uno de estos métodos ampliamente utilizado en la síntesis es el uso del proceso de calentamiento por microondas donde su eficiencia reduce los tiempos de reacción de horas (incluso días) a minutos [121].

Este método ha surgido como un método prometedor para la síntesis de diversas nanopartículas; es más eficiente en términos de la energía utilizada, de la homogeneidad de la temperatura, y es rápido en comparación a las fuentes de calor convencionales.

La síntesis asistida de nanopartículas metálicas por microondas ha sido reportada por diversos investigadores. Hussain *et al.* [122] realizaron en el 2010, la síntesis de nanopartículas de níquel utilizando a la L-cisteína como agente reductor y estabilizante utilizando como medio de solvente el etilenglicol. Ellos observaron las interacciones que tenían las variables con respecto a la obtención del plasmón característico de las nanopartículas de níquel, observado en el análisis de UV-vis.

Las variables a considerar fueron la concentración de cisteína, el tiempo de calentamiento en microondas y el pH, en los cuales encontraron los valores de las variables observándose un máximo de absorción del plasmón superficial, los cuales fueron un pH de 7.4 y una concentración molar 1:6 (Níquel: Cisteína) a un tiempo de calentamiento de 1 min.

Estos valores indican un máximo de absorción del plasmón superficial, sin embargo en su discusión de resultados no explican directamente el fenómeno que ocurre en su sistema, se sabe que un máximo de absorción del plasmón superficial se puede deber a diversos factores presentes en el sistema nanométrico, tales como el tamaño y

concentración de las nanopartículas, por lo tanto, decir que este máximo se debe a una mayor concentración de nanopartículas es incorrecto si no se cuenta con evidencia.

En el 2014 Zhao *et al.* [123] reportaron la síntesis de nanopartículas de Ag utilizando alginato como agente reductor y el método de MW en disolvente agua. Se variaron los parámetros de pH, tiempo de calentamiento en MW, concentración de la reducción de iones del agente reductor y de la plata; utilizando la técnica UV-vis para observar el LSPR para cada experimento. Ellos encontraron los parámetros óptimos para sintetizar nanopartículas de Ag a los 8 minutos, siendo más bajo que otros métodos (incluyendo biosíntesis [124]) los cuales toman un periodo mayor de síntesis. [125, 126].

Sin embargo, su método de encontrar el máximo de absorción del plasmón característico de las nanopartículas de plata es deficiente, debido a que realizan un solo cambio de variable, la cual van tomando como “óptima” y la dejan sin cambio al momento de considerar otra variable. Esto es un grave error, debido a que un diseño de experimentos se centra en la interacción que tienen diversas variables con respecto a una respuesta, por lo cual si se realiza una experimentación como la reportada por Zhao *et al.* no se observarían las interacciones entre estas variables y el sistema en cuestión.

Baruwati *et al.* [127] en el año 2009 reportaron un método de síntesis de nanopartículas utilizando microondas. En su experimentación utilizaron glutatión, un péptido que contiene 3 unidades de aminoácidos los cuales son el ácido glutámico, glicina y la cisteína, siendo esta última la molécula responsable de proporcionar el poder reductor al péptido. La síntesis de las nanopartículas de plata fue comprobada por la técnica de UV-visible y DRX al encontrar el plasmón característico de las nanopartículas, así como la reflexión característica del espectro de difracción. El uso de la técnica de MW redujo drásticamente el tiempo de síntesis.

Sin embargo, el uso de MW no sólo está relacionado con el tiempo de reacción, sino también con el disolvente, siendo un factor importante a considerar ya que absorbe la energía de microondas de manera diferente. Los disolventes tienen una polaridad diferente en cada molécula, y, en consecuencia, afecta a la energía absorbida del campo de microondas. Como regla general, un disolvente más polar tiene un dipolo fuerte para provocar el movimiento de rotación más rápido con el fin de alinearse con el campo eléctrico que esta cambiante. Un compuesto que es menos polar no será tan perturbado por los cambios del campo y, por lo tanto, no absorbería mucha energía de microondas. La mayoría de los disolventes orgánicos se pueden dividir en tres categorías diferentes para su uso como disolventes en el método MW: baja, media o alta absorción (Figura 7)[128].

Nivel de Absorbancia	Solventes
Alta	DMSO, EtOH, MeOH, propanol, nitrobenzeno, ácido fórmico y etilenglicol.
Media	Agua, DMF, NMP, butanol, acetonitrilo, HMPA, metiletilcetona, acetona y nitrometano.
Baja	Cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, 1,4-Dioxano, THF, glima, etil acetato, benzeno, clorobenzeno, xileno y hexano.

Figura 9 Solventes ordenados por su nivel de absorbancia de la energía de MW.

### 2.3 Funcionalización de nanopartículas

Con el fin de explotar los usos de las nanopartículas para bio-aplicaciones, su superficie debe ser funcionalizada para proporcionar estabilidad, biocompatibilidad y la funcionalidad para diversas aplicaciones. Para modificar adecuadamente la superficie de las nanopartículas para producir la funcionalidad y la estabilidad deseada en las nanopartículas, la encapsulación de la superficie, la síntesis *in situ* o los enfoques de autoensamblaje son los que han sido utilizados. Sin embargo, el desarrollo de la

funcionalización de la superficie de las nanopartículas, las aplicaciones y el diseño de nuevos métodos están siendo investigados.

La superficie funcionalizada de las nanopartículas que se conjugan con biomoléculas, tales como péptidos, proteínas o ácidos nucleicos se utilizan en aplicaciones biológicas. Uno de los métodos más utilizados para la unión de biomoléculas con aminas primarias, ácidos carboxílicos y tioles en nanopartículas se basa en la formación de un enlace covalente, que es adecuado para las nanopartículas como la plata [129] oro [130] *quantum dots* (QD's) [131] entre otras nanopartículas inorgánicas [131].

La unión covalente se puede realizar mediante la introducción de grupos carboxilo en la superficie de las nanopartículas, entonces el acoplamiento con biomoléculas puede realizarse mediante una modificación química con productos que contienen grupos amino tales como péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos. El uso de anticuerpos para la funcionalización de las nanopartículas proporciona las propiedades de las nanopartículas como una entidad química individual con el reconocimiento específico y selectivo de los anticuerpos a los antígenos.

Las nanopartículas de oro y plata [132] han sido funcionalizadas con anticuerpos para detección [133] e imagen celular [134]. Uno de los métodos más utilizados para la funcionalización de los anticuerpos a las nanopartículas es el acoplamiento del grupo amino a través de la química EDC/NHS [135], donde es necesario para la funcionalización que exista un grupo carboxilo en el sistema y éste se puede encontrar en el agente estabilizante de la nanopartícula. A continuación, el grupo amino presente



en el anticuerpo reaccionará con el grupo carboxilo de la nanopartícula que resulta en la formación de un enlace amida que conecta el anticuerpo con la nanopartícula.

Existen dos aplicaciones principales de los conjugados nanopartículas-anticuerpos: la terapia y el diagnóstico. En la terapia, la administración de fármacos y la reparación de tejidos son las principales aplicaciones de estos conjugados. En el diagnóstico, las aplicaciones se pueden dividir en *in vivo* y en la experimentación *in vitro*, y esas aplicaciones son las imágenes de resonancia magnética (MRI), la detección, clasificación de células, bioseparación, inmovilización de enzimas, inmunoensayos, transfusión (la entrega de genes), y la purificación, por nombrar algunos [136].

Las aplicaciones en detección han ganado el interés de la investigación en los últimos años debido a la importancia de las ciencias biomédicas y medioambientales para encontrar métodos altamente sensibles y rentables para la detección de analitos biológicos.

La introducción de las nanopartículas en el campo del diagnóstico molecular ha representado una ventaja en muchos casos para las técnicas de detección bien establecidas basados en fluoróforos, tales como PCR y ELISA. Las nanopartículas ofrecen sus propiedades físicas al biosensor. En algunos casos, las nanopartículas se utilizan simplemente como portadores de anticuerpos para el reconocimiento por asociación en biosensores [137].

## 2.4 Nanopartículas como sensores

Los sensores tienen dos componentes funcionales: el elemento de reconocimiento para proporcionar la unión con el analito y un componente transductor para la señalización de la interacción selectiva/específica. Las nanopartículas de superficie funcionalizada también se consideran sensores, donde las nanopartículas con sus propiedades características y sus ligandos en la superficie funcionalizada actúan como componentes de transductor y de reconocimiento, respectivamente [138].

En un sistema de biosensor, la recolección de la señal saliente de la detección podría hacerse utilizando diferentes métodos, incluyendo los ópticos, magnéticos, electroquímicos, piezoeléctricos, mecánicos y de espectrometría de masas. En los estudios plasmónicos, los métodos ópticos tales como UV-vis [139, 140] y SERS [141] se han utilizado para la detección de analitos biológicos. La importancia de estos métodos es tener una detección sensible y precisa de analitos en muestras de fluidos humanos para la detección temprana y el tratamiento y gestión de enfermedades.

Recientemente, las nanopartículas plasmónicas se han utilizado para la detección de diversas especies biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos y entidades biológicas como los virus y bacterias. Por ejemplo, Barlen *et al.* [142] en el 2007, informaron sobre una detección específica de serotipos de *Salmonella* por SPR utilizando nanoprismas de oro. Los nanoprismas de oro fueron depositados en vidrio de sílice para acoplarse con el anticuerpo policlonal *anti-Salmonella*, que se utiliza para capturar serotipos de bacterias de *Salmonella*. Luego fue seguido por la detección de

*Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. El método ofrece los límites más bajos de detección para las bacterias, el límite de detección fue de  $2.50 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> y  $2.50 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Esto demuestra las propiedades útiles, sensibles y selectivas que las nanopartículas plasmónicas pueden tener.

En 2013, Lee *et al.* [143] desarrollaron un sensor plasmónico sensible para la detección del virus VIH-1. Ellos funcionalizaron la superficie de la nanoestructura de oro con anticuerpos de VIH-1 para medir las concentraciones de VIH-1 de una manera cuantitativa. El límite de detección de este biosensor es de 200 fg/mL, y las ventajas para el uso de este biosensor son la preparación rápida, alta sensibilidad y selectividad.

## **2.5 Detección de RSV**

La detección de entidades biológicas de enfermedades respiratorias tales como virus de la influenza [144, 145], se han llevado a cabo mediante la detección basadas en el uso de nanopartículas, para la detección de RSV hay informes utilizando nanopartículas de plata [97] basadas en el método SERS y de QD's (CdTe) [91, 93] utilizando UV-vis; sin embargo, el uso de SERS y de los QD's hacen una manera costosa para la detección, y utiliza productos químicos tóxicos como el cadmio.

Existen muchos métodos reportados para la detección RSV tales como la fluorescencia, los inmunoensayos y los métodos moleculares biofísicos. En la detección basada en la fluorescencia el método más utilizado y comercializado para la detección de RSV es el anticuerpo de fluorescencia directa (DFA) y se basa en la detección microscópica de RSV usando un anticuerpo que está conjugado con un fluoróforo. Aunque es un procedimiento sencillo; éste método es susceptible a errores humanos debido a que el

criterio para observar si una célula está o no en el sistema (si presenta fluorescencia) depende de la observación humana.

En las detecciones utilizando inmunoensayos, ELISA es el método más ampliamente utilizado para la detección RSV, además de que presenta ensayos de diagnóstico comerciales y hospitalarios. Este método se basa en la detección de unión y colorimetría específica de una interacción antígeno-anticuerpo, con una alta especificidad y sensibilidad.

La técnica de PCR por tiempo real se utiliza para amplificar, detectar o cuantificar simultáneamente una molécula de ADN. Es el método más estudiado y desarrollado en las detecciones moleculares, es altamente sensible y tiene bajos límites de detección, siendo un procedimiento de prueba en los hospitales, su desventaja es que es un método caro [146].

En los métodos biofísicos, existen sólo procedimientos de investigación para la detección de RSV, destacando los siguientes métodos: PCR acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray (PCR-ESI-MS) y SERS. El procedimiento utilizando PCR-ESI-MS es un método altamente sensible y específico, incluso a nivel de cepa, no sólo para el RSV, sino también para los patógenos en múltiples detecciones [147, 148]; sin embargo, también es un procedimiento costoso. Por otro lado, SERS es una detección rápida y no destructiva de analitos con una alta sensibilidad [149, 150] pero los costos (para el uso y la compra de los equipos) y los tratamientos de la muestra representan las desventajas más importantes para esta técnica.

## 2.6 Eficacia de la detección

La detección de cualquier analito biológico está influenciada por muchos factores experimentales tales como:

- a) El tratamiento físico de la muestra
- b) Tratamiento químico de la muestra
- c) Condiciones de medición

Además de verificar si un método es viable para usarse en detección, la especificidad es crítica en muestras biológicas, debido a las complejas mezclas de muchas sustancias químicas en el sistema. Esto hace que sea necesario poner a prueba el rendimiento de cualquier método de detección cuantitativa en algunas condiciones químicas o biológicas. Un método de detección es deseable si es altamente específico para el analito en cuestión.

En resumen, las nanopartículas metálicas se han utilizado ampliamente debido a sus propiedades ópticas como los LSPR. Para explotar esta propiedad, estas nanopartículas están constantemente en investigación para su uso en diversas aplicaciones incluyendo la detección. Se ha utilizado el método de reducción química para la síntesis de estas nanopartículas, específicamente para la síntesis de nanopartículas de cobre, plata y oro utilizando productos químicos tóxicos para su reducción y/o estabilización. De esta manera las biomoléculas están surgiendo como sustitutos de las moléculas convencionales. También, las síntesis tradicionales utilizadas en este método no proporcionan una manera fácil, barata y rápida para sintetizar nanopartículas. Para la solución de este problema; el método basado en microondas se

ha utilizado para reducir el tiempo y la energía para la síntesis de este tipo de nanopartículas.

Para lograr la aplicación de detección en sistemas biológicos, las nanopartículas deben tener un proceso de funcionalización, para tener una biocompatibilidad y selectividad hacia los analitos biológicos. La funcionalización de anticuerpos se ha usado para la aplicación de las nanopartículas en terapia y el diagnóstico. El método de detección, una parte importante del diagnóstico, aplica estas nanopartículas para detectar bacterias y virus, tales como el RSV. La detección de este virus incluyendo los procedimientos de fluorescencia; inmunoensayos, métodos moleculares y biofísicos son técnicas con ventajas como los bajos límites de detección y su alta sensibilidad, sin embargo, son costosas. Los métodos biofísicos no han sido explotados a diferencia de otros métodos. Por ello es importante desarrollar un método biofísico que permite la preparación fácil, barata y rápida para la detección de RSV.

## **2.8 Hipótesis**

Se sintetizan nanopartículas metálicas de Au, Ag y Cu en etilenglicol utilizando como agentes reductores y estabilizadores a la L-cisteína y el alginato de sodio mediante radiación de microondas, teniendo propiedades características para su uso como sensores plasmónicos

## 2.9 Objetivos

### 2.9.1 Objetivo general

Sintetizar las nanopartículas metálicas de Ag, Au y Cu por microondas, en etilenglicol utilizando al alginato y L-cisteína como agentes reductores y estabilizantes.

### 2.9.2 Objetivos específicos

Observar la respuesta característica de las nanopartículas metálicas por medio de la técnica de UV-visible.

Seleccionar el experimento que obtuvo la mayor absorción plasmónica.

Determinar la morfología, estructura y análisis elemental de las partículas por medio del análisis microestructural por las microscopías electrónica de barrido, transmisión y la espectroscopia dispersiva de rayos X.

Determinar la distribución del tamaño de partícula mediante un barrido de dispersión de la luz.

Realizar la funcionalización para las nanopartículas utilizando un anticuerpo policlonal.

Realizar el sensado del microorganismo RSV utilizando como control a las nanopartículas no funcionalizadas a diferentes tiempos.

Verificar la especificidad del experimento con los microorganismos de *S. entérica*, *Adenovirus* y *P. aeruginosa*.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas metálicas

Las síntesis de nanopartículas se realizaron siguiendo un diseño de experimentos para la obtención de los diferentes tipos de nanopartículas variando dos parámetros, tiempo de reacción en microondas y la concentración del metal. En la siguiente tabla se especifican los valores de las variables consideradas, la concentración está definida en milimolar [mM].

Tabla 2 Especificaciones de las variables consideradas en el diseño de experimentos.

	Tiempo de reacción [min]			Concentración inicial del metal [mM]			pH
<b>Metal</b>	<i>Alto</i>	<i>Medio</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Medio</i>	<i>Bajo</i>	<i>Máximo</i>
Oro	3	2	1	10	0.2	0.004	12.9
Plata	3	2	1	10	0.2	0.004	10
Cobre	3	2	1	10	0.2	0.004	8

Para llevar a cabo la reacción se siguió el diseño de experimentos realizado para los tres metales de interés utilizando dos reductores (Ver Tabla 2), considerando que se hará un diseño tipo factorial  $3^2$ .



*Tabla 3 Experimentos del diseño factorial 3<sup>2</sup>.*

<b>Experimento</b>	<b>Tiempo de reacción</b>	<b>Concentración del reductor</b>
<b>1</b>	ALTA	ALTA
<b>2</b>	ALTA	BAJA
<b>3</b>	ALTA	MEDIA
<b>4</b>	BAJA	ALTA
<b>5</b>	BAJA	BAJA
<b>6</b>	BAJA	MEDIA
<b>7</b>	MEDIA	ALTA
<b>8</b>	MEDIA	BAJA
<b>9</b>	MEDIA	MEDIA

De manera general se colocó en un recipiente de vidrio de 100 mL, 6.6 mL del agente reductor 10 mM, 3.3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M y se completó a 100 mL, se llevó al pH adecuado dependiendo del metal (ver tabla 1), posteriormente se separaron en 9 viales de vidrio y se añadió 1 mL de la solución 10 mM del ion metálico de interés a las diferentes concentraciones y se llevó a calentamiento al horno de microondas con el tiempo especificado en el diseño y se analizaron por UV-vis para escoger el experimento con la más alta absorción plasmónica.

Debido a que no se pudieron sintetizar las nanopartículas de cobre y plata utilizando a la L-cisteína, los análisis realizados para la síntesis utilizando esta molécula (exceptuando el TEM) son exclusivamente para los experimentos de oro.

### 3.1.1 Análisis por FESEM

El experimento con la máxima absorción plasmónica fue analizado por la técnica de FESEM, en el caso de los experimentos con L-cisteína solo se realizó para las nanopartículas de oro. Para ello, se utilizó un sustrato de aluminio previamente pulido

y lavado con agua destilada y acetona por 3 veces. En el sustrato se colocó una gota de la solución de nanopartículas y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Los análisis se realizaron en un equipo FESEM en un microscopio JEOL FESEM

### 3.1.2 Análisis por TEM

Se realizó un análisis TEM para los experimentos utilizando alginato de sodio, y se hizo utilizando el equipo Zeiss EM 10C 10CR TEM (Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Alemania) y fue utilizado para examinar la morfología y tamaño de las nanopartículas metálicas. Las soluciones de nanopartículas se aislaron en agua usando una centrífuga a 12,000 rpm, a continuación, se lavaron con agua destilada 3 veces y se sonicaron durante 10 segundos, a continuación, se dispersaron en agua con 0,5 mL para los experimentos de cobre y oro y 2 mL para los experimentos de plata. Se colocaron 10  $\mu$ L de cada experimento y luego se colocaron sobre una rejilla de cobre (revestida de carbono, 200 mesh) y se secó a temperatura ambiente.

## 3.2 Funcionalización de nanopartículas

Una vez establecido el experimento con la mayor absorción plasmónica de cada nanopartícula metálica, se repitió con el objetivo de funcionalizarse con un anticuerpo policlonal. Para ello, en un vaso de precipitado, se añadió 9 mL de etilenglicol, 0.6 mL de agente reductor (alginato de sodio o L-cisteína) 10 mM y 0.3 mL de  $\text{NaCO}_3$  0.1 M. A continuación, la solución se agitó y el pH se ajustó a 11, 10 y 12.5 para los experimentos de cobre, plata y oro respectivamente (considerando solo el experimento de oro utilizando la L-cisteína).

Para los experimentos de cobre y oro, después de haberse ajustado el pH, la solución se mezcló con 1 mL de solución 10 mM de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{HAuCl}_4$ . Para los experimentos de plata se añadió 0.0018 g de  $\text{AgNO}_3$  y 1 mL de etilenglicol. A continuación, el vaso de precipitado se colocó en el horno de microondas (MW) durante 3 min, 1 min y 1 min para los experimentos de cobre, plata y oro (correspondientes a los experimentos de oro de alginato y L-cisteína), y se observó un cambio de color rojizo, gris y púrpura para cada sistema, respectivamente.

En ese punto, se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min para los experimentos de cobre y plata y a 8000 rpm para el oro, se lavó con agua destilada 3 veces utilizando la misma velocidad y tiempo para cada experimento.

Las soluciones se concentran a 0.5 mL para el cobre y oro y 2 mL para la plata, luego se colocó bajo sonicación durante 10 segundos y se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se analizó por UV-Vis en el equipo Beckman Coulter DU 800.

El proceso de funcionalización fue desarrollado utilizando el protocolo EDC. Este proceso se hizo mediante la adición de 0.0015 g de EDC en un tubo Eppendorf, luego se añadió 1.5 mL de agua destilada (1 mg/mL). Luego, esta solución se esterilizó utilizando un filtro para esterilización.

En otro tubo Eppendorf, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de EDC, 200  $\mu\text{L}$  de nanopartículas. y luego se añadió 2.5, 5 y 10  $\mu\text{L}$  de anticuerpo policlonal (4 mg/mL). La solución se mezcló por vortex durante 10 segundos y luego se colocó en un equipo agitador de placas a temperatura ambiente durante 3 h.

Todos los tubos Eppendorf (de todos los experimentos) se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 min. Se eliminó el sobrenadante y se almacenó, al tubo Eppendorf con el

pellet se le añadió 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se sometió a sonicación durante 10 segundos y se analizó por espectrofotometría UV-VIS tomando 10  $\mu\text{L}$  de la solución de nanopartículas, y se completó con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

### 3.2.1 Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula y el potencial zeta de las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas se midieron usando un equipo Zetasizer (Nano-ZS; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). Las soluciones de nanopartículas se diluyeron en 2 mL agua destilada colocando 50  $\mu\text{L}$  de la muestra con un pH de  $6.58 \pm 0.23$ . Las mediciones para cada muestra se repitieron tres veces. El promedio de las mediciones y su nivel de confianza al 95% se tomaron como valores finales.

### 3.2.2 Cuantificación del anticuerpo conjugado

El protocolo BCA (*Bicinchoninic acid assay*) se utilizó para conocer la cantidad de proteína unida a las nanopartículas elegidas para la detección RSV. El protocolo BCA se utilizó de acuerdo con la compañía Thermo Fisher Company. Se tomó 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante almacenado (correspondiente al experimento que se escogió para la funcionalización) y se colocó en una microplaca. A continuación, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  del reactivo (protocolo BCA) de trabajo a cada *pocillo*, y se mezclaron durante 30 segundos. La microplaca se cubrió y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, la absorbancia se midió a 562 nm en un lector de placas.

### 3.3 Detección del virus RSV.

La detección de RSV se realizó tomando 10  $\mu\text{L}$  de nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas (experimento de control) y se colocaron en un tubo Eppendorf. Después, se añadieron en tubos diferentes 2.5  $\mu\text{L}$  (500 PFU), 5  $\mu\text{L}$  (1000 PFU) y 10  $\mu\text{L}$  (2.000 PFU) de la solución de RSV y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador de placas a tres diferentes temperaturas, las cuales fueron 30, 60 y 120 min, con tres repeticiones cada uno. La solución se analizó usando un espectrofotómetro UV-vis después de completar a 60  $\mu\text{L}$  con agua destilada.

#### 3.3.1 Especificidad

Con el fin de observar la especificidad en diferentes sistemas con una bacteria fuera del entorno sistemático y 2 microorganismo que afectan al ser humano de la misma manera que el RSV y que pueden estar presentes en muestras de esta enfermedad, fueron analizados los experimentos con nanopartículas no funcionalizadas con el microorganismo externo, nanopartículas funcionalizadas con el microorganismo externo y las nanopartículas funcionalizadas con el microorganismo externo+RSV. Los microorganismos externos utilizados fueron *Salmonella enterica*, *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Adenovirus*.

En un tubo Eppendorf, se colocó 10  $\mu\text{L}$  de nanopartículas (funcionalizadas y/o no funcionalizadas), luego se añadió 1  $\mu\text{L}$  (100 CFU), 2.5  $\mu\text{L}$  (250 CFU) y 5  $\mu\text{L}$  (500 CFU) en los experimentos con bacterias y 2.5  $\mu\text{L}$  ( $2.7 \times 10^4$  PFU), 5  $\mu\text{L}$  ( $5.5 \times 10^4$  PFU) y 10  $\mu\text{L}$  ( $1.1 \times 10^5$  PFU) para el Adenovirus. En los experimentos donde se añadió el microorganismo+RSV, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  (1000 PFU) de la solución de RSV y todos los

experimentos se incubaron durante 120 minutos para los experimentos de cobre y el oro (alginato y L-cisteína) y 60 min para los experimentos de plata, después fueron analizados utilizando el espectrofotómetro UV-VIS.

### **3.4 Análisis estadísticos**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron utilizando el software OriginLab <sup>TM</sup> 9 y fueron presentados como el  $\pm$  error estándar de los promedios. Los resultados se sometieron al ANOVA de dos vías, y la prueba de Tukey fue aplicado para la detección de RSV y los experimentos de especificidad. Las diferencias fueron significativas a  $p < 0,05$  (\*).

### **3.5 Disposición de los residuos**

Disposición de residuos de acuerdo al reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se dispondrá de los experimentos de cobre en el contenedor C y de plata y oro en el F, correspondientes a residuos con solventes no halogenados y a reciclo de metales preciosos respectivamente.

Los experimentos que contienen el RSV se dispondrán en los recipientes designados para el manejo de residuos biológico-infecciosos.

## **CAPÍTULO 4**

## RESULTADOS

### **4.1 Síntesis, caracterización, funcionalización de las nanopartículas y detección del virus RSV utilizando a la L-cisteína.**

#### **4.1.1 Síntesis de las nanopartículas metálicas.**

Los análisis UV-vis de los experimentos para los 3 sistemas utilizando a la L-cisteína como agente reductor y estabilizante, se muestran en la Figura 10. Los sistemas de cobre y plata muestran una absorción a 360 nm para todas las concentraciones y tiempos en MW, en el caso del sistema de oro, el rango del espectro en la longitud de onda fue disminuido con el fin de enfocar más la absorción plasmónica superficial. Para el sistema de plata, para los 3 experimentos con la concentración alta (10 mM), se observa una larga absorción entre los 600 y 1000 nm.

El sistema de oro, para las muestras con la concentración a 10 mM y los 3 tiempos de reacción en MW, muestra la absorción característica a 540 nm relacionada al LSPR de las nanopartículas esféricas de oro.

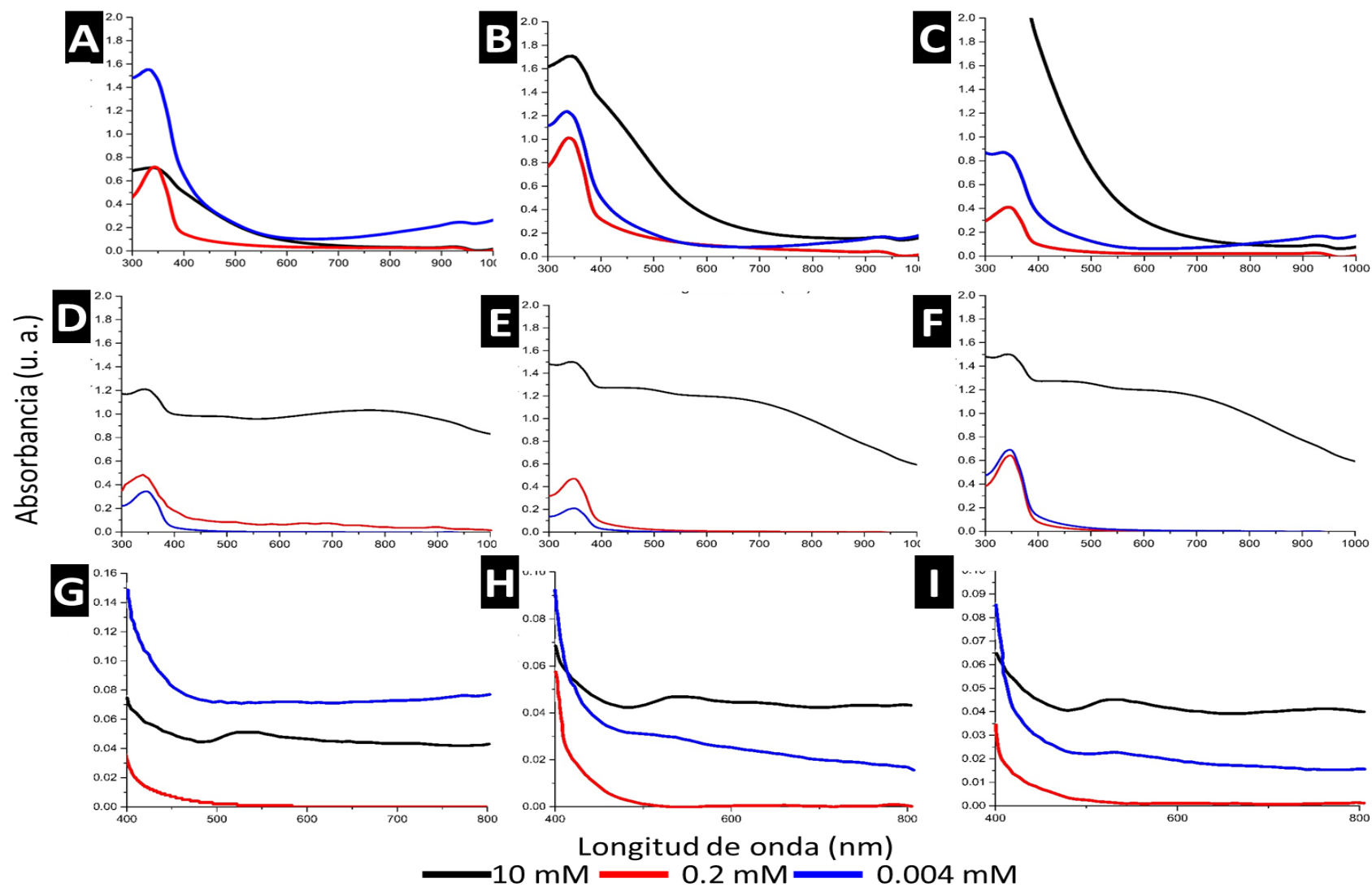


Figura 10 Análisis UV-vis para la síntesis de nanopartículas de cobre (A, B, C), plata (D, E, F) y oro (G, H, I) utilizando L-cisteína con un tiempo de reacción en MW de 3 min (A, D, G) 2 min (B, E, H) y 1 min (C, F, I).



### 3.1.1.1 Análisis por FESEM y EDS

Los análisis posteriores solo se realizaron a las nanopartículas de oro, las cuales fueron las únicas sintetizadas utilizando a la L-cisteína como agente reductor y estabilizante.

Las micrografías FESEM para las nanopartículas de oro sintetizadas son mostradas en la Figura 11. En ellas se puede observar la presencia de nanopartículas menores a 100 nm correspondientes a una morfología esférica. La magnificación en ambas micrografías nos permite enfocar el análisis solo a este tipo de nanopartículas aisladas.

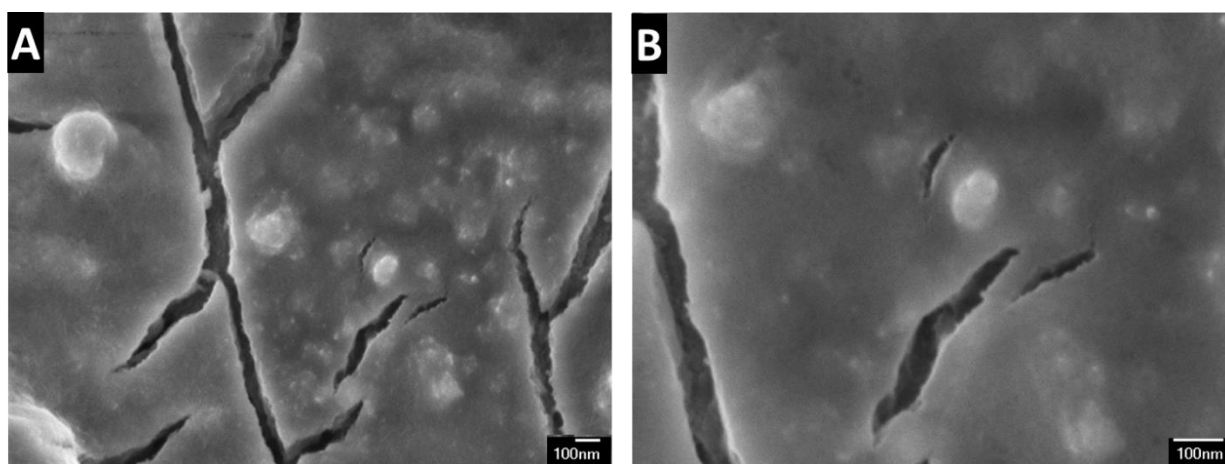


Figura 11 Micrografías FESEM para las nanopartículas metálicas de A) oro utilizando L-cisteína y B) magnificación de la micrografía.

De la misma manera se realizó el análisis por EDS a estas nanopartículas mostrando en la micrografía (Figura 12 A) aglomerados de nanopartículas de oro. A este aglomerado se le realizó el análisis EDS de mapeo elemental encontrándose que los aglomerados son compuestos por el oro.

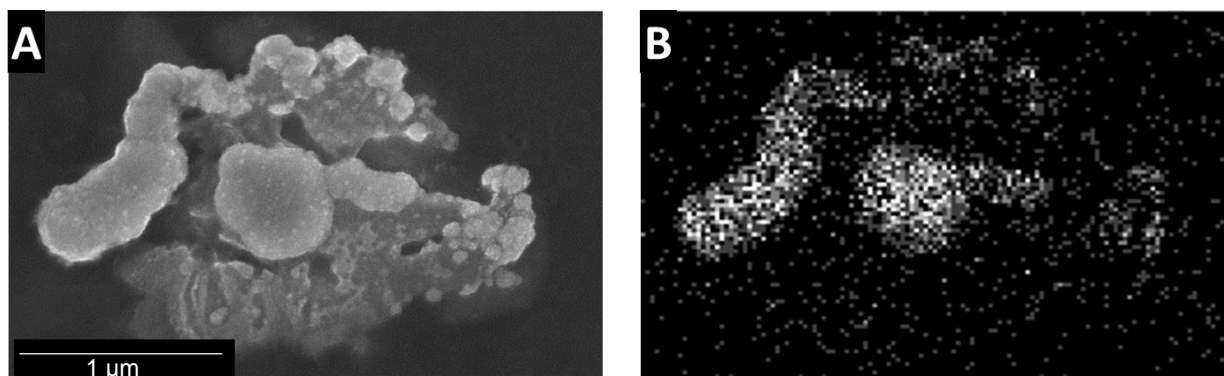


Figura 12 Análisis EDS de mapeo elemental para las nanopartículas de oro (A y B) oro utilizando L-cisteína.

#### 4.1.2 Funcionalización de las nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro, sintetizadas con una concentración de 10 mM del precursor metálico y con un tiempo de 1 min fue elegida para realizarse su funcionalización. En el espectro UV-vis (Figura 13) muestra los análisis realizados por esta técnica a los experimentos de funcionalización. Se puede observar que a medida que aumenta la concentración del anticuerpo policlonal añadido al sistema (con una concentración de 4 mg/mL) el LSPR tiene un aumento en el desplazamiento hacia el rojo. Además, la anchura del pico del plasmón aumenta de la misma manera a como aumenta la concentración.

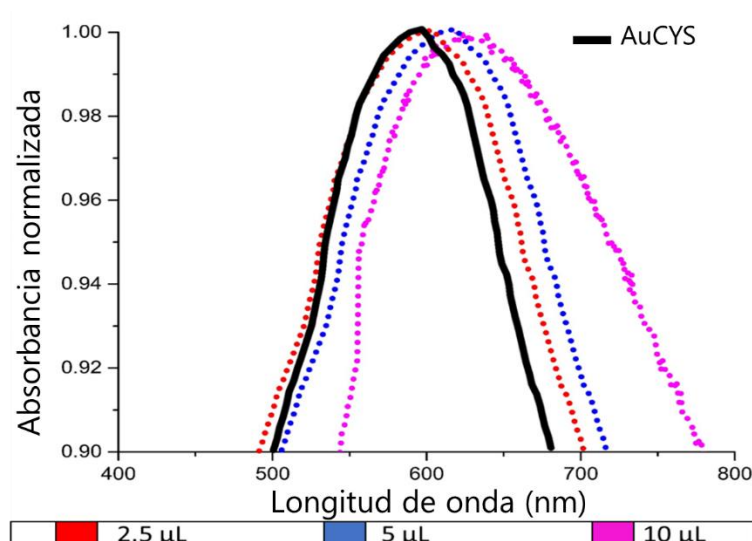


Figura 13 Espectro UV-vis para los experimentos de funcionalización para las nanopartículas de oro utilizando un anticuerpo policlonal.

#### 3.1.2.1 Distribución del tamaño de partículas y potencial zeta.

La distribución del tamaño de partícula fue analizada para las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas de oro. En la Figura 14 se muestra el análisis DLS para estos experimentos.

El promedio de la distribución del tamaño de partícula para las nanopartículas no funcionalizadas (Figura 14 A) se encuentra a  $195 \pm 13$  nm, al funcionalizarlas (Figura 14 B), éste tamaño aproximadamente se duplica a  $403 \pm 4$  nm.

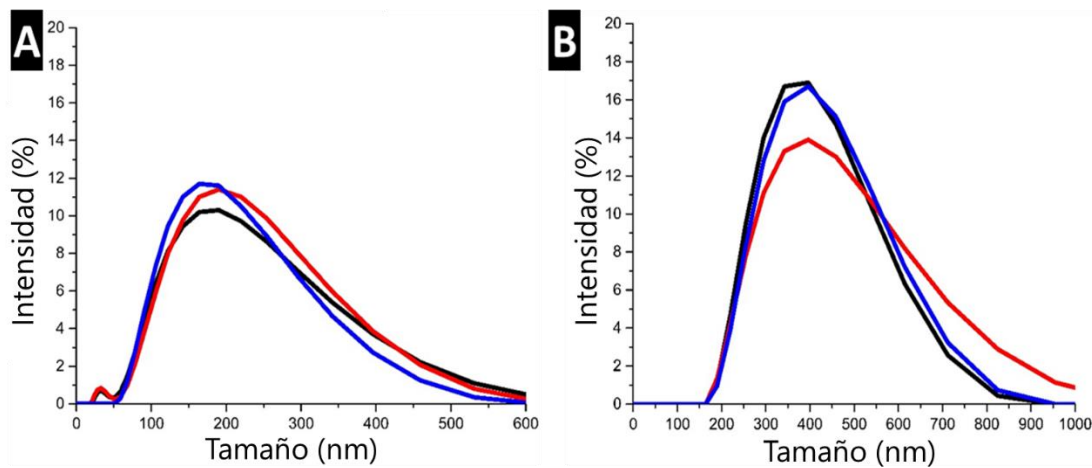


Figura 14 A) Distribución del tamaño de partícula para las nanopartículas de oro antes y B) después de la funcionalización.

De la misma manera se realizó el análisis de potencial zeta a ambas muestras (Figura 15), las nanopartículas no funcionalizadas muestran un potencial de -33 mV y al funcionalizarse este potencial aumenta a -18 mV

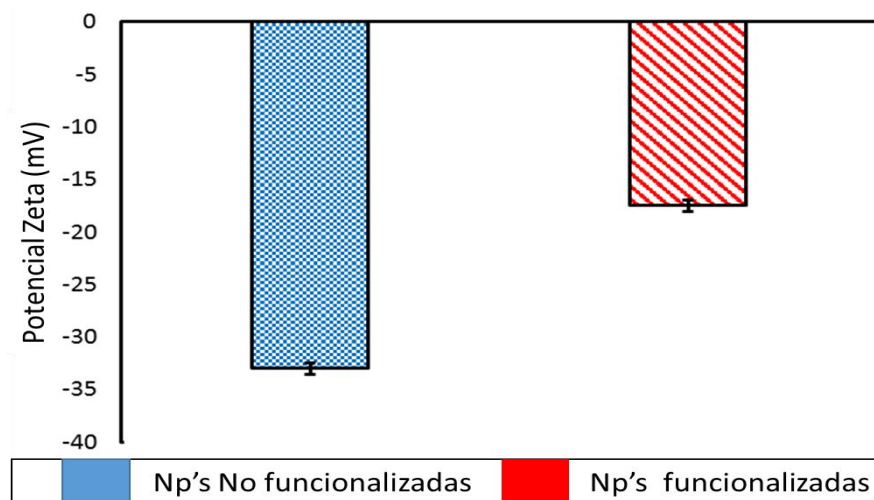


Figura 15 Potencial zeta para las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas de oro.

#### 4.1.3 Detección del virus RSV.

Las siguientes figuras representan los experimentos de detección de RSV. La Figura 16 muestra el análisis UV-vis (y sus repeticiones) a 30 min (Figura 16 A), 60 min (Figura 16 B) y 120 min (Figura 16 C) utilizando las nanopartículas de oro funcionalizadas para la detección de RSV a 500, 1000 y 2000 PFU, respectivamente. La Figura 17 muestran los experimentos de nanopartículas no funcionalizadas (y sus réplicas) mencionados anteriormente, con las mismas concentraciones de RSV. Las repeticiones de estos experimentos se mostrarán en el apéndice A.

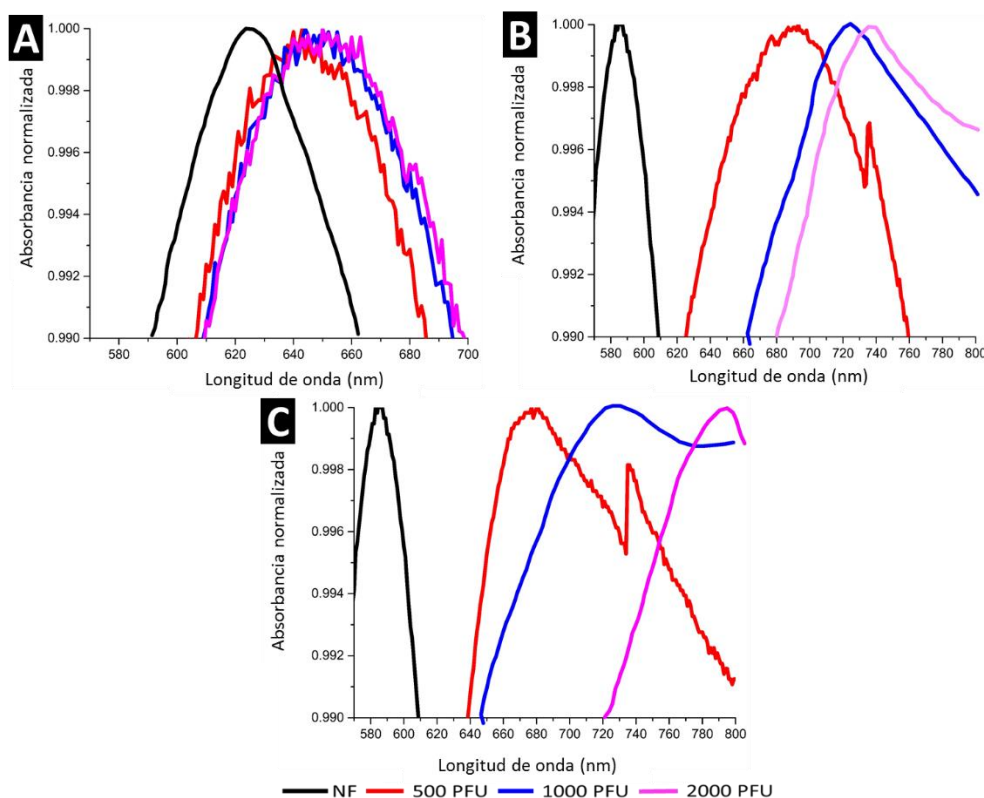


Figura 16 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas funcionalizadas de oro a 30 min (A) 60 min (B) y 120 min (C).

Las nanopartículas funcionalizadas interactuando con el RSV a 30 min un desplazamiento hacia el rojo de aproximadamente 22 nm. Éste aumenta ligeramente conforme se aumenta la cantidad de virus presente en la muestra. El patrón se encuentra en los tiempos de 60 y 120 min, aunque los desplazamientos del LSPR son aún mayores (aproximadamente de 40 y 60 nm, respectivamente). Los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas estando en contacto con el RSV a 30 min muestran un corrimiento aún mayor (aproximadamente de 40 nm), sin embargo, no se puede encontrar una relación directa entre el desplazamiento y la cantidad de RSV presente en el sistema. Estos desplazamientos del LSPR también aumenta al incrementar el tiempo, pero al igual que 30 min no se puede encontrar un patrón como en el tiempo anterior.

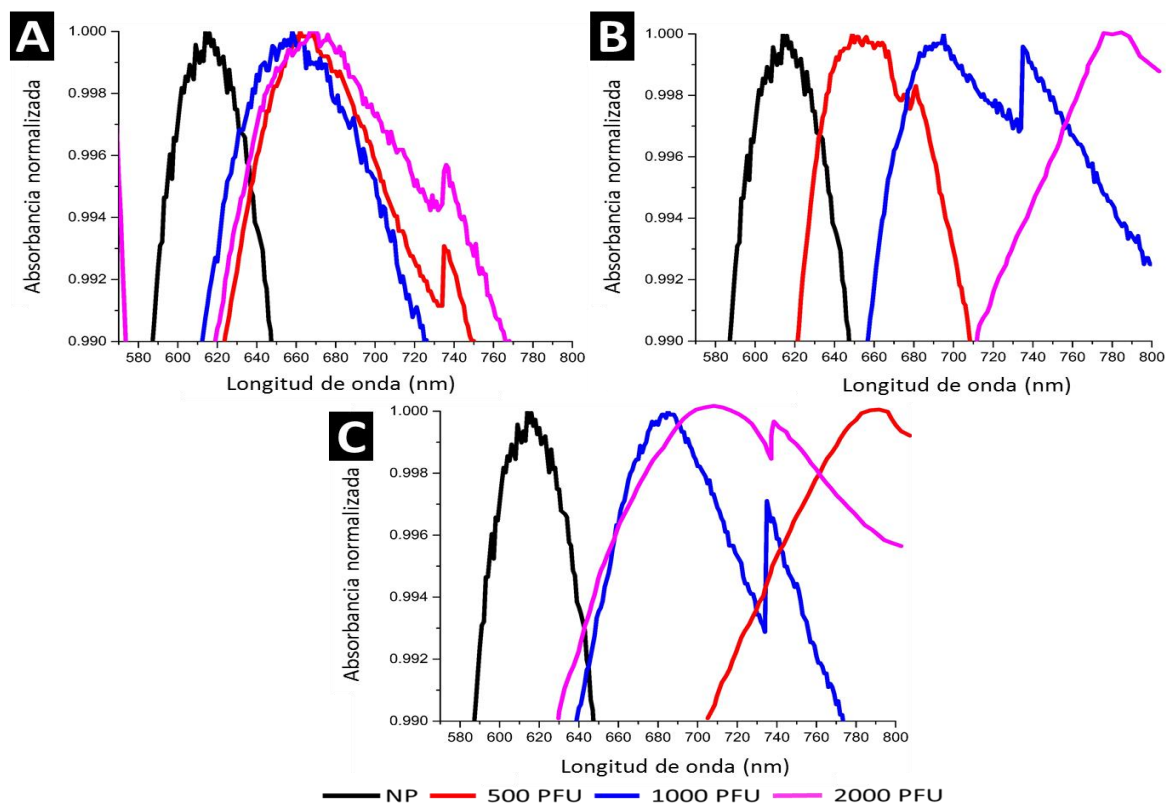


Figura 17 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas no funcionalizadas de oro a 30 min (A, B y C) 60 min (D, E y F) y 120 min (G, H e I)

## **4.2 Síntesis, caracterización, funcionalización de las nanopartículas y detección del virus RSV utilizando al alginato de sodio.**

### **4.2.1 Síntesis de las nanopartículas metálicas.**

Los análisis UV-vis de los experimentos para los sistemas de cobre, plata y oro utilizando al alginato de sodio como agente reductor y estabilizante, se muestran en la Figura 17. Los experimentos de cobre muestran que a 1 y 3 min de reacción en MW a las tres diferentes concentraciones de cobre (II) no muestran ninguna absorción característica del LSPR de nanopartículas de cobre. En cambio, a los 2 minutos de reacción para la muestra con las concentraciones media y alta, se encuentra una absorción característica de las nanopartículas de cobre, esta absorción se encuentra a 595 nm del espectro electromagnético.

Para los experimentos de plata a los 3 tiempos diferentes de reacción y con concentración de 10 mM, muestran la absorción característica del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, esta absorción se encuentra a los 399 nm. También la muestra expuesta a 2 min en MW con la concentración más baja, muestra la misma absorción plasmónica.

En el caso de los experimentos de oro, la única muestra que presenta una absorción característica de un LSPR es aquella con en la cual se utiliza una concentración de 10 mM y un tiempo de 1 min en MW. Aunque esta muestra a los otros dos tiempos demuestra una absorción en el rango similar al plasmón superficial, ésta es muy pequeña para ser considerada.

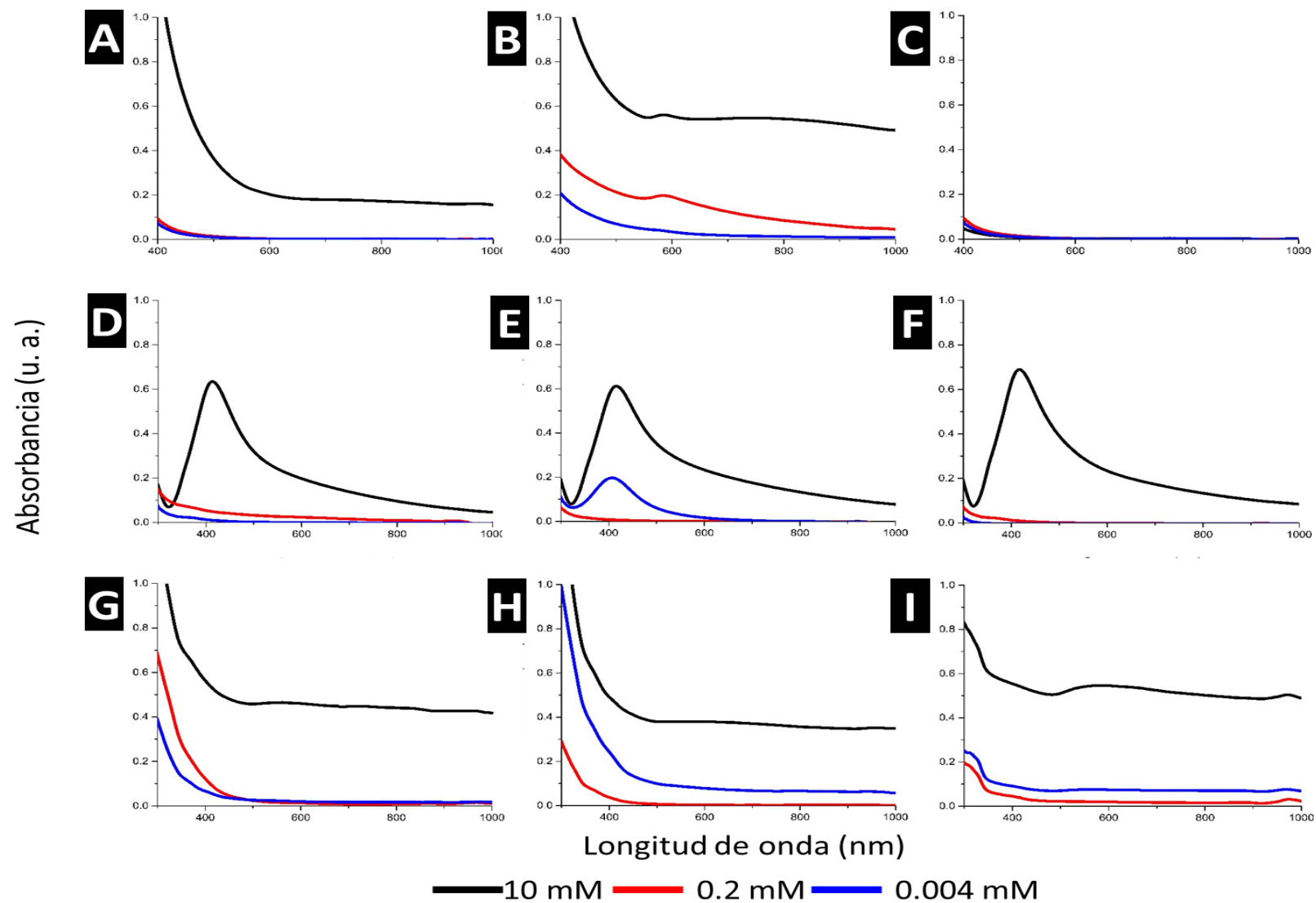


Figura 18 Análisis UV-vis para la síntesis de nanopartículas de cobre (A, B, C), plata (D, E, F) y oro (G, H, I) utilizando alginato de sodio con un tiempo de reacción en MW de 3 min (A, D, G) 2 min (B, E, H) y 1 min (C, F, I).



### 3.2.1.1 Análisis por FESEM y EDS

Las muestras de cobre con un tiempo de reacción de 2 min, la de plata y oro a 1 min de tiempo en MW, todas con una concentración de 10 mM de cada ión metálico, fueron escogidas para realizarse los siguientes experimentos de caracterización, funcionalización y detección.

El análisis por FESEM para estas muestras se presenta en la Figura 19. Para la muestra de cobre (Figura 19 A) se pueden observar partículas que están por debajo de los 100 nm, sin embargo, existen aglomerados en el sistema que superan este tamaño.

Para la plata (Figura 19 B), se pueden apreciar que las nanopartículas están demasiado aglomeradas y forman cúmulos muy grandes del tamaño micrométrico. Para el oro (Figura 19 C), esta característica de aglomerados se presenta por igual, aunque, estos aglomerados están compuestos por nanopartículas que tienen un tamaño mucho menor a los 100 nm, formando estructuras tipo cadena.

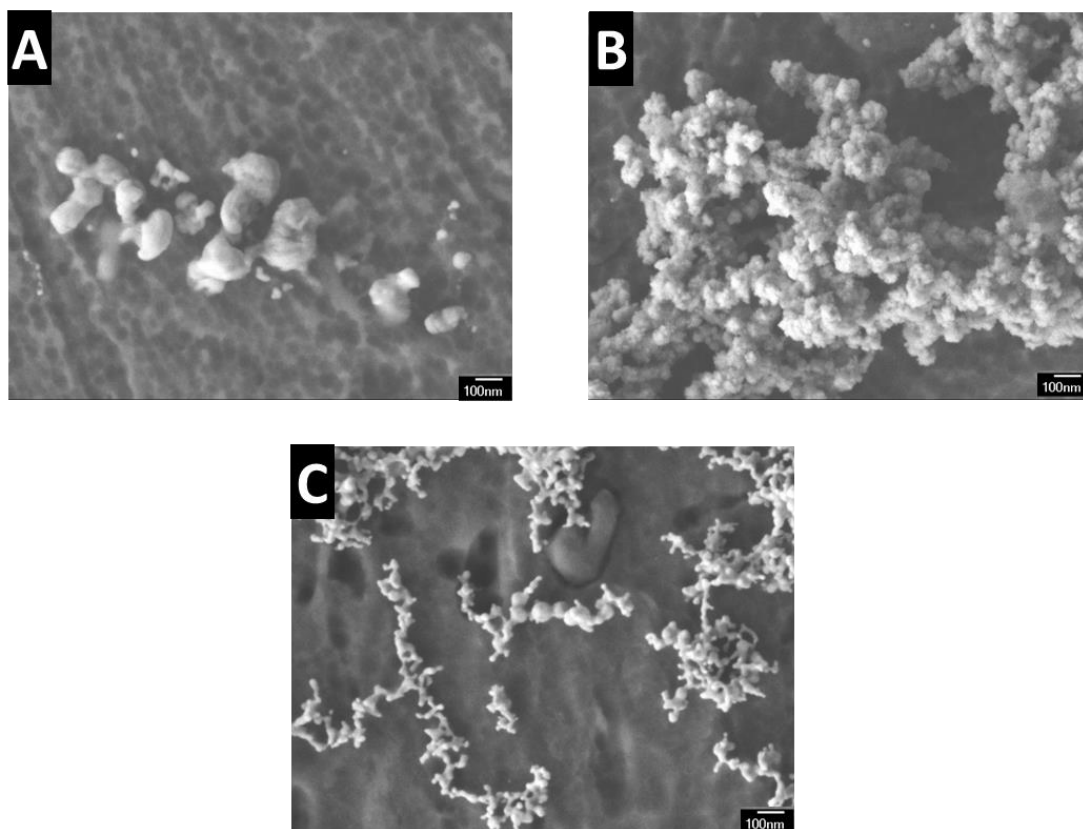


Figura 19 Micrografías FESEM para las nanopartículas no funcionalizadas de A) cobre, B) plata y C) oro utilizando alginato de sodio.

El análisis EDS fue realizado de la misma para las muestras por FESEM. Para la muestra de cobre (Figura 20 A y B) se observa en la micrografía los mismos aglomerados que en FESEM, además, éstos se componen del elemento cobre. Para la plata (Figura 20 C y D) y oro (Figura 20 E y F) muestran, al igual que el cobre, que estos sistemas se componen del elemento de interés.

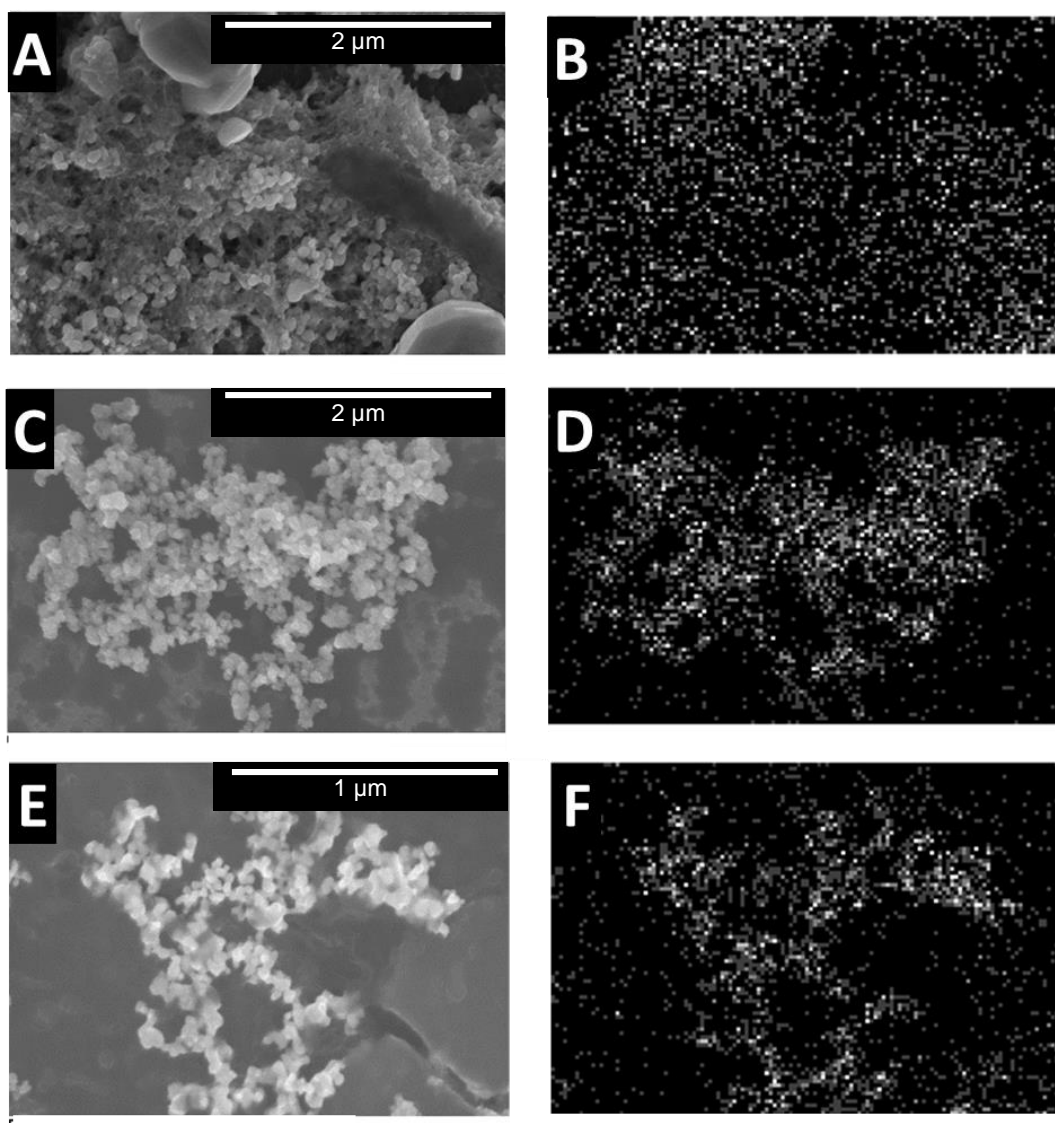


Figura 20 Análisis EDS de mapeo elemental para las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A y B), plata (C y D) de oro (E y F).

### 3.2.1.2 Análisis por TEM

Las micrografías TEM de las nanopartículas no funcionalizadas de cobre, plata y oro se muestran en la Figura 21 con un aumento de 125.000 X, las nanopartículas de cobre (Figura 21 A), muestra una variedad de tamaños que van aproximadamente de los 50 a los 200 nm con una morfología esférica no uniforme. También es evidente la aglomeración de nanopartículas para formar grandes cúmulos.

Las nanopartículas de plata y oro muestran tamaños menores a 100 nm, y muestran una morfología esférica. Ambas muestras presentan aglomerados, aunque la plata los presenta en menor medida.

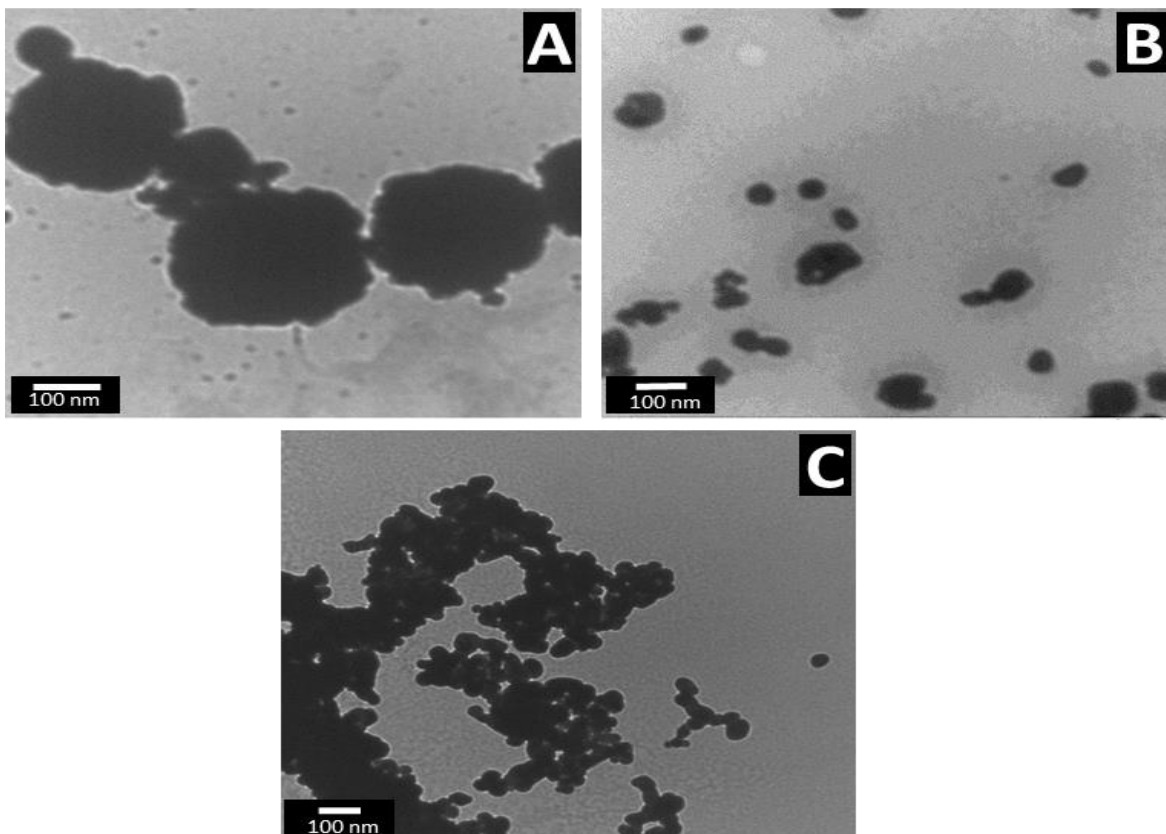


Figura 21 Micrografías TEM para las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A), plata (B) y oro (C).

#### 4.2.2 Funcionalización de nanopartículas.

En este apartado se muestra la funcionalización de las nanopartículas de las muestras escogidas de cobre, plata y oro. De manera general los análisis UV-vis (Figura 22) muestran el plasmón característico de cada metal de interés además de su interacción con el anticuerpo policlonal representado por un desplazamiento del LSPR a diferentes concentraciones. Cabe destacar que las concentraciones del anticuerpo están

representadas con los 3 diferentes volúmenes de 2.5, 5 y 10  $\mu\text{L}$  provenientes de una concentración de 4 mg/mL.

Los experimentos de cobre (Figura 22 A) muestran el desplazamiento del LSPR cuando interactúa con el anticuerpo. Se puede observar que al agregar 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo el desplazamiento es mayor al compararse con los otros dos sistemas, además el LSPR sufre un ensanchamiento. Para los experimentos de plata (Figura 22 B), el LSPR muestra un desplazamiento similar para todos los tres experimentos con las diferentes concentraciones, el ensanchamiento en estos experimentos es menor al agregarse la mayor concentración del anticuerpo, siendo indirectamente proporcional para los demás experimentos, este patrón se repite con respecto a la anchura de banda del plasmón. En el caso del oro (Figura 22 C), sólo la concentración media (utilizando 5  $\mu\text{L}$ ) muestra un desplazamiento. El proceso de funcionalización escogido para realizarse la detección del RSV será utilizando 5  $\mu\text{L}$  de Ab para el cobre y oro, para la plata será de 10  $\mu\text{L}$ .

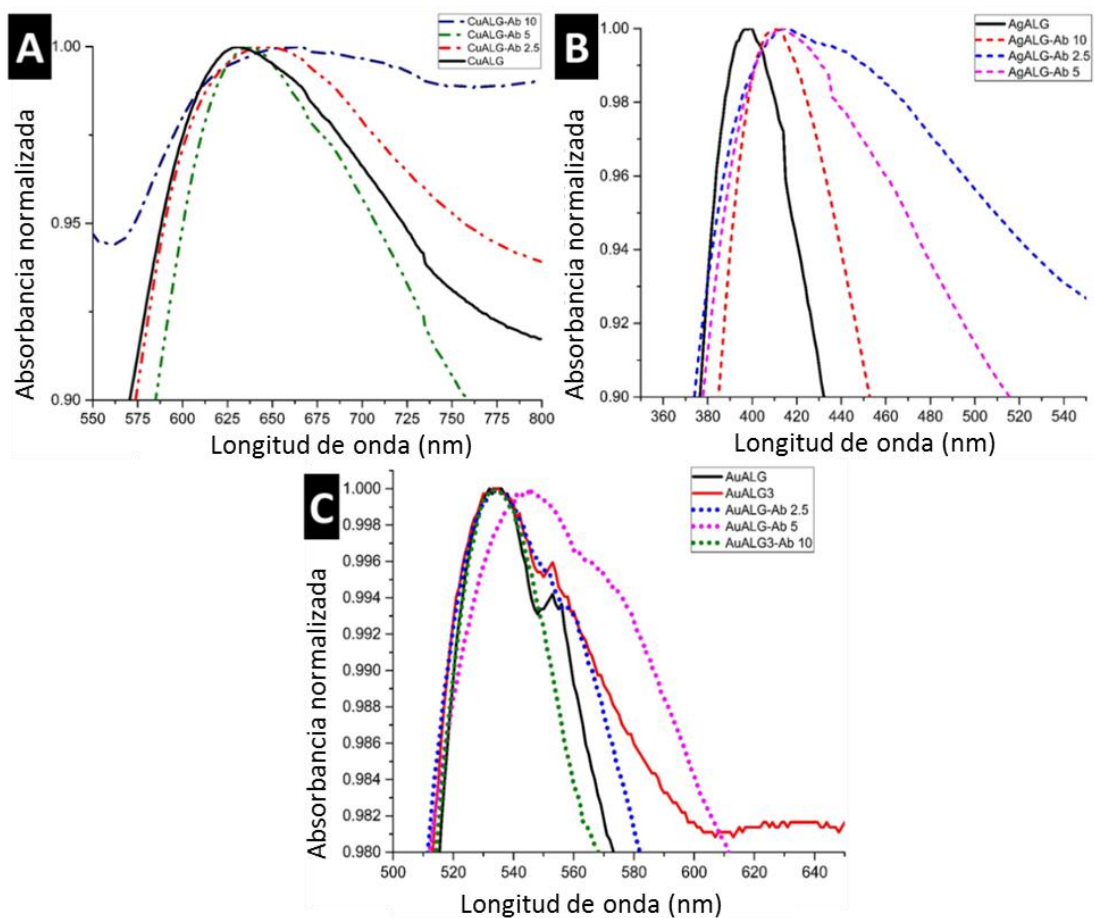


Figura 22 Análisis UV-visible para las nanopartículas sintetizadas utilizando alginato su funcionalización para A) cobre, B) plata y C) oro.

### 3.2.2.1 Distribución del tamaño de partícula y potencial zeta.

La distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas se muestra en la Figura 23, repitiéndose tres veces para el análisis estadístico. Las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (Figura 23 A) su tamaño fue de  $254 \pm 11.11$  nm; para las nanopartículas de plata y de oro (Figura 23 D y E), se produjo una distribución similar, con un pico de 10 a 20 nm y otro a  $151 \pm 0.57$  nm y  $185 \pm 4.37$  nm, respectivamente.

Las nanopartículas funcionalizadas (Figura 23 B, E y G) muestran tamaños más grandes que las no funcionalizadas. Para cobre y plata, los tamaños aumentan aproximadamente

150 nm, y para las nanopartículas de oro, los dos picos de distribución aumentan a  $118 \pm 2.82$  nm y  $585 \pm 52$  nm.

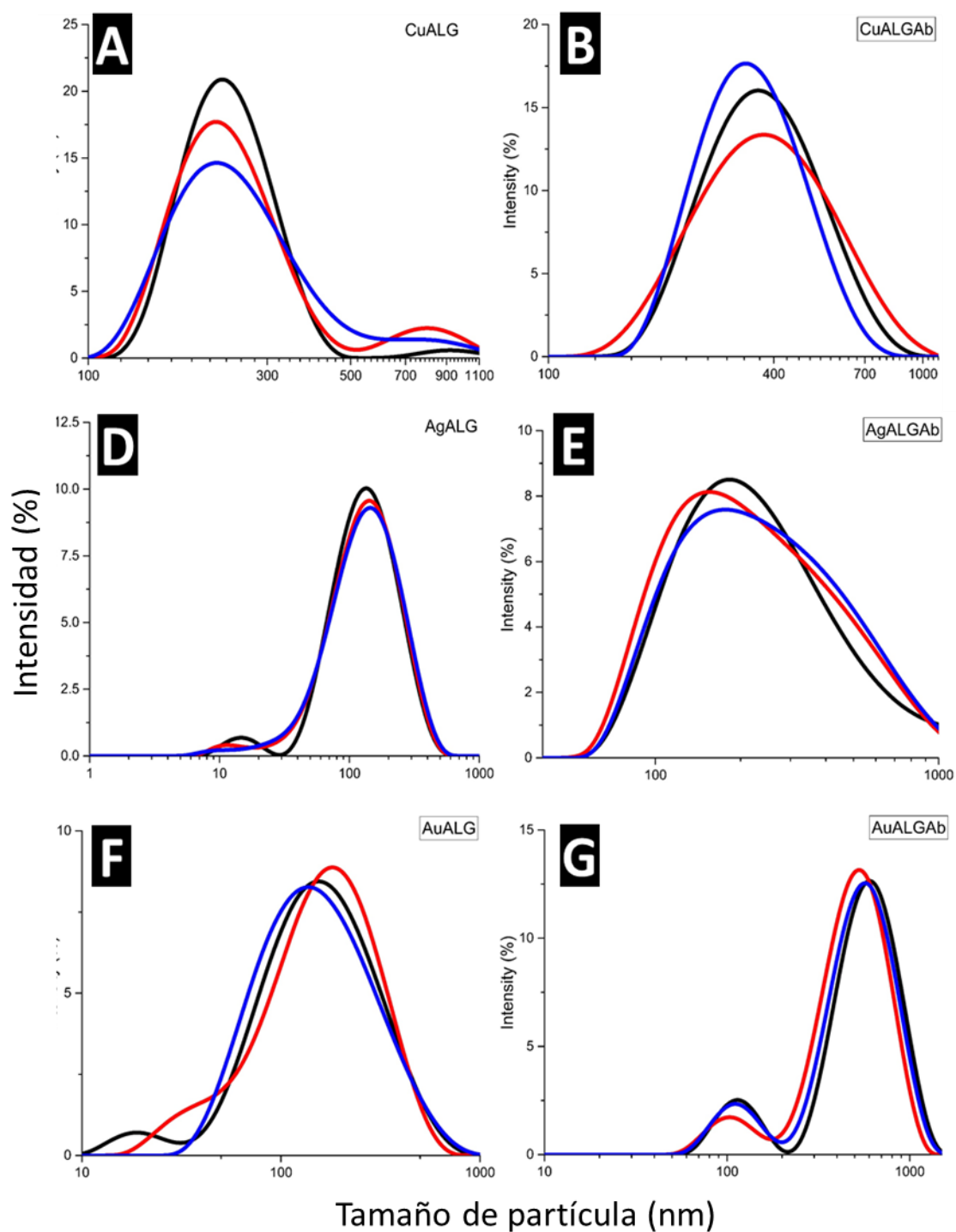


Figura 23 Distribución del tamaño de partícula para las nanopartículas de A) cobre, D) plata y F) oro y para las nanopartículas funcionalizadas de B) cobre, E) plata y G) oro.

El análisis de potencial zeta (Figura 24) se llevó a cabo para los 3 sistemas. Las nanopartículas de cobre tienen un potencial de  $-17.2 \pm 3.2$  mV y la nanopartícula funcionalizada mostró un potencial positivo de  $10 \pm 0.83$  mV.

Las nanopartículas de plata y oro muestran un potencial de  $-37 \pm 2.2$  mV y  $-40 \pm 0.4$  mV respectivamente y las nanopartículas funcionalizadas pasan de un potencial muy negativo a  $-18 \pm 0.12$  mV para las nanopartículas de plata y de  $-20 \pm 0.9$  mV para el oro.

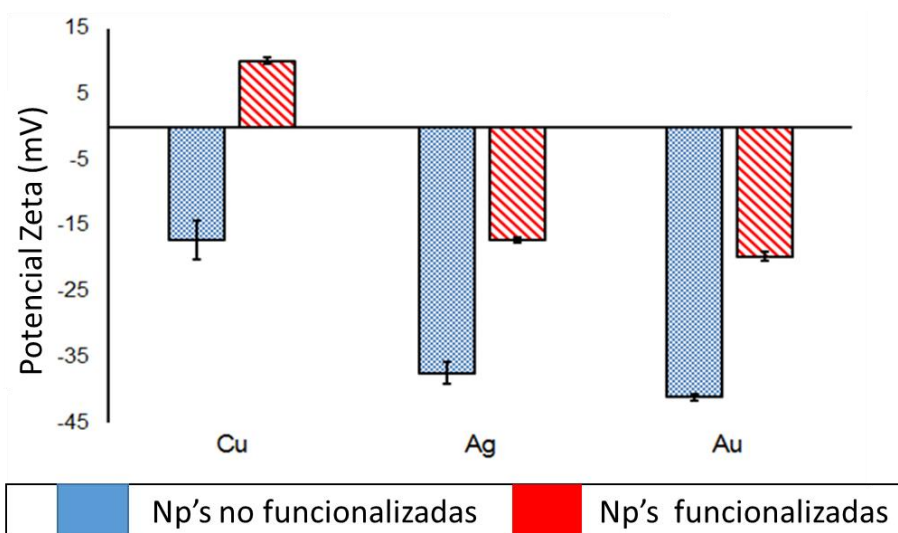


Figura 24 Potencial zeta para las nanopartículas funcionalizadas (rojo) y las no funcionalizadas (azul).

### 3.2.2.2 Conjugación del anticuerpo

El sobrenadante proveniente de la funcionalización se sometió a una estimación proteica utilizando el protocolo BCA para determinar el anticuerpo conjugado a las nanopartículas.

El anticuerpo unido a la superficie de nanopartículas de cobre fue  $18.56 \pm 0.38$   $\mu$ g de 20  $\mu$ g,  $33.6 \pm 0.49$   $\mu$ g de 40  $\mu$ g para los experimentos de plata y  $11.04 \pm 1.6$   $\mu$ g de 20  $\mu$ g para el oro.



#### 4.2.3 Detección del RSV.

La detección del RSV fue realizada con las nanopartículas funcionalizadas, sin embargo, como experimento control se utilizaron las nanopartículas no funcionalizadas. La Figuras 25 muestra los análisis UV-vis de la detección de RSV utilizando las nanopartículas funcionalizadas a los 30, 60 y 120 min a una cantidad de virus de 500, 1000 y 2000 PFU, respectivamente.

Las Figuras 26 muestra los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas (y sus réplicas) al mismo tiempo y cantidades de RSV. Todas las repeticiones de los experimentos se encuentran en el apéndice A.

Cuando las nanopartículas funcionalizadas están en contacto con el RSV a 500 PFU mostraron desplazamientos en el LSPR para las muestras de cobre y plata; Sin embargo, para las nanopartículas de oro los cambios de desplazamiento del LSPR son nulos en la mayoría de los casos.

En los experimentos donde se utilizan nanopartículas no funcionalizadas con la cantidad igual de RSV, para cobre y oro los cambios del LSPR son negativos, para la plata, los cambios del plasmón son positivos en todas sus interacciones de tiempo.

Para 1000 y 2000 PFU de RSV, los experimentos utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre y oro, se muestran desplazamientos mayores que a 500 PFU, mostrándose en la mayoría de los casos un incremento del desplazamiento del LSPR a medida que se aumenta el tiempo de interacción. Para la plata, estos desplazamientos son similares que a los experimentos de 500 PFU.

En el caso de las nanopartículas no funcionalizadas, los patrones a 500 PFU son similares a 1000 y 2000 PFU.

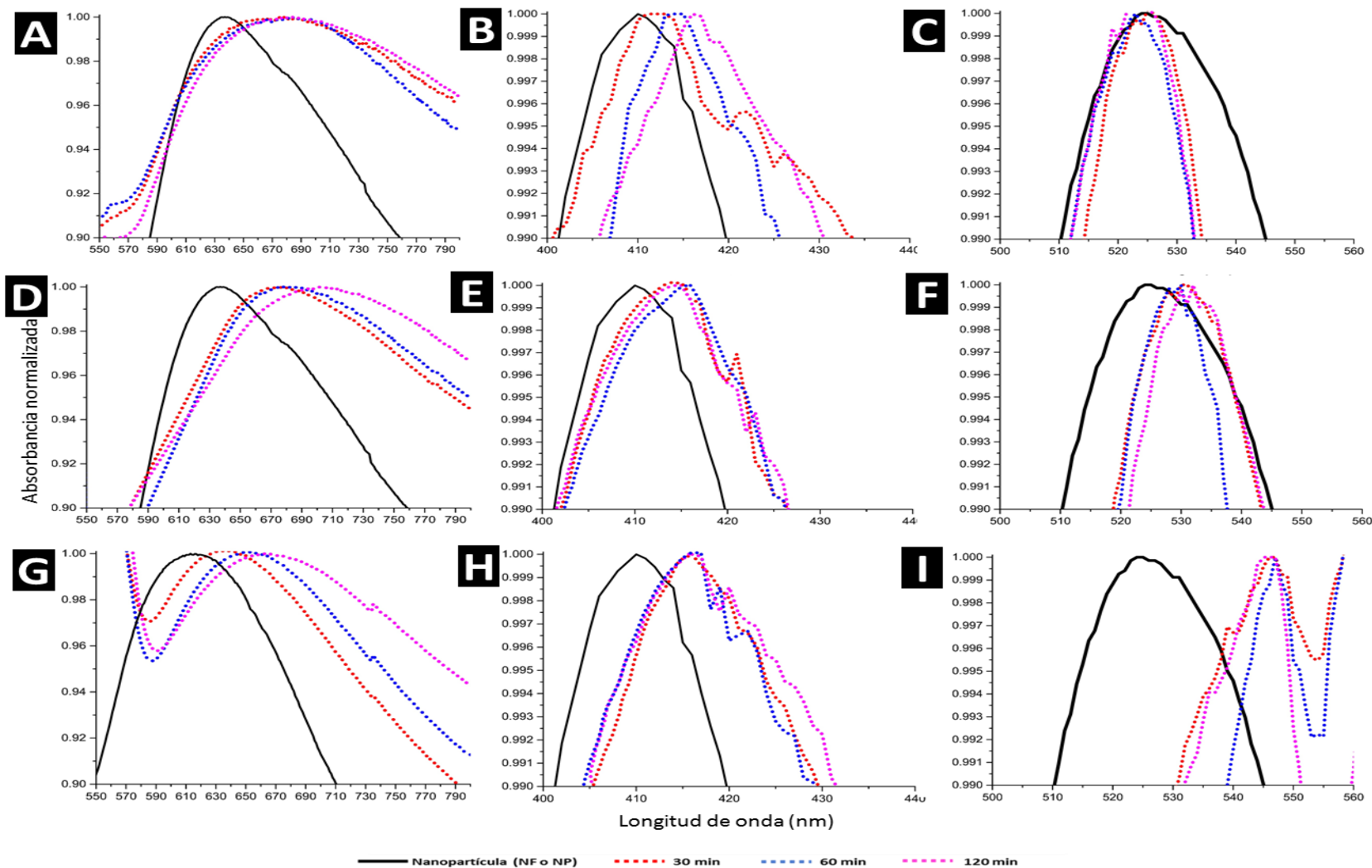


Figura 25 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU (A, B y C), 1000 PFU (D, E y F) y 2000 PFU (G, H e I) de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, D y G), plata (B, E y H) y oro (C, F e I).

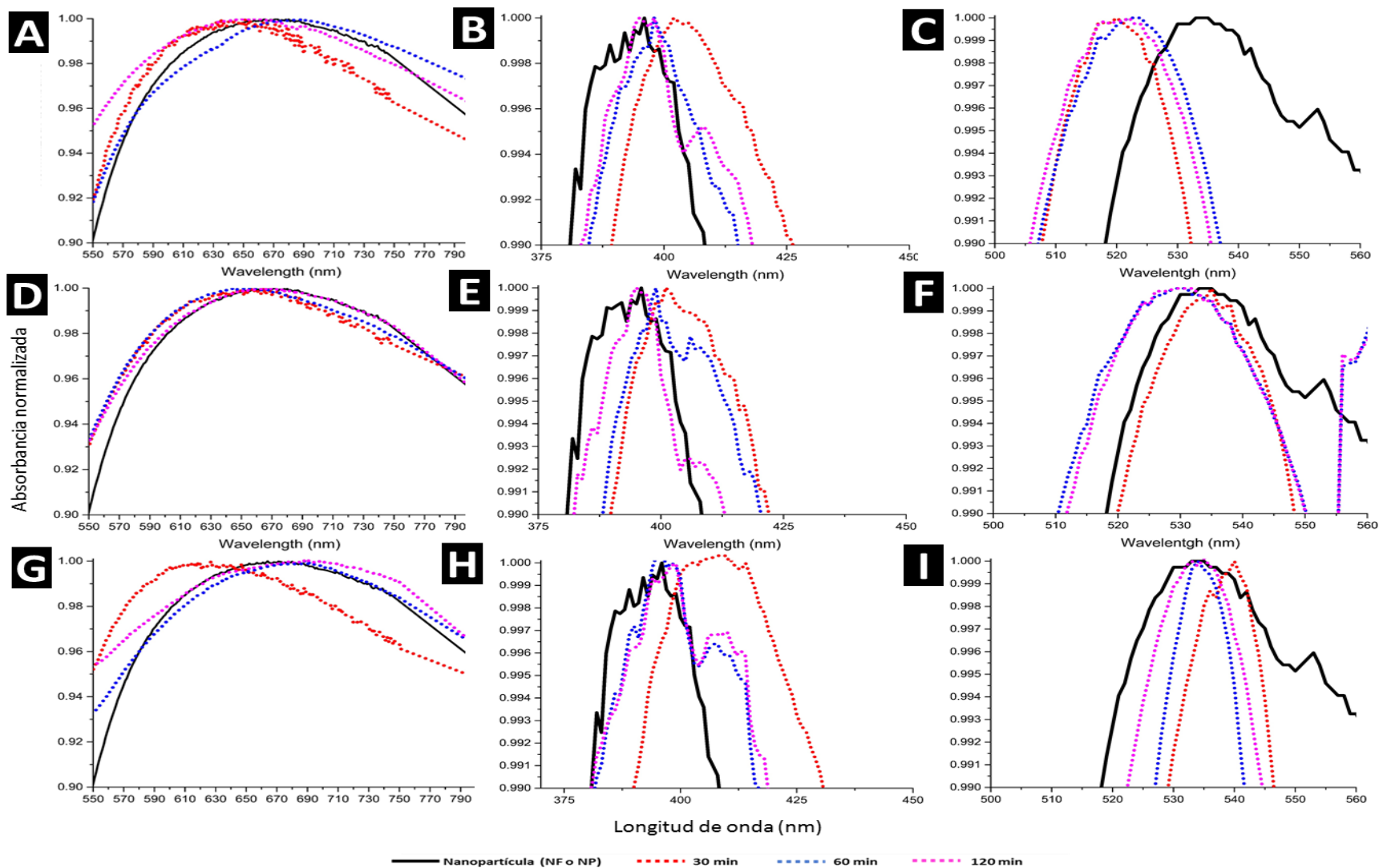


Figura 26 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU (A, B y C), 1000 PFU (D, E y F) y 2000 PFU (G, H e I) de RSV a 30, 60 y 120 min.

utilizando nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, D y G), plata (B, E y H) y oro (C, F e I).

#### 4.2.3.1 Especificidad y reactividad cruzada

Con el fin de evaluar la especificidad de la detección de RSV, las nanopartículas se sometieron a 3 tipos de experimentos: nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas con el microorganismo externo y otro más con las nanopartículas funcionalizadas en contacto con el RSV y el otro microorganismo.

Las nanopartículas de cobre y oro se incubaron a 120 min y plata a 60 minutos (debido a la linealidad de cada experimento en la detección del RSV) con los microorganismos de *Salmonella enterica ser. Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Adenovirus*.

Para la interacción utilizando la bacteria *S. enterica* y las nanopartículas no funcionalizadas (Figura 31) se puede observar como las nanopartículas de cobre, plata y oro muestran un desplazamiento del LSPR en todas las cantidades de la bacteria, aunque es mayor en los experimentos de cobre, y aumenta su desplazamiento a cantidades mayores.

En los experimentos utilizando a las nanopartículas funcionalizadas y la misma bacteria (Figura 32), para las nanopartículas de oro y plata existen pequeños desplazamientos para los 3 sistemas diferentes de nanopartículas y prácticamente son similares entre las diferentes cantidades de bacteria. Para el cobre si existen desplazamientos mayores y estos aumentan a medida que aumenta la cantidad de bacteria.

Cuando se realiza el experimento de reactividad cruzada con el RSV (Figura 33), para las nanopartículas funcionalizadas de cobre, tienen un pequeño desplazamiento del LSPR para todas las cantidades de bacteria, siendo el mismo patrón para las nanopartículas de oro; sin embargo, para la plata, no existe desplazamiento y en algunos casos son desplazamientos negativos.

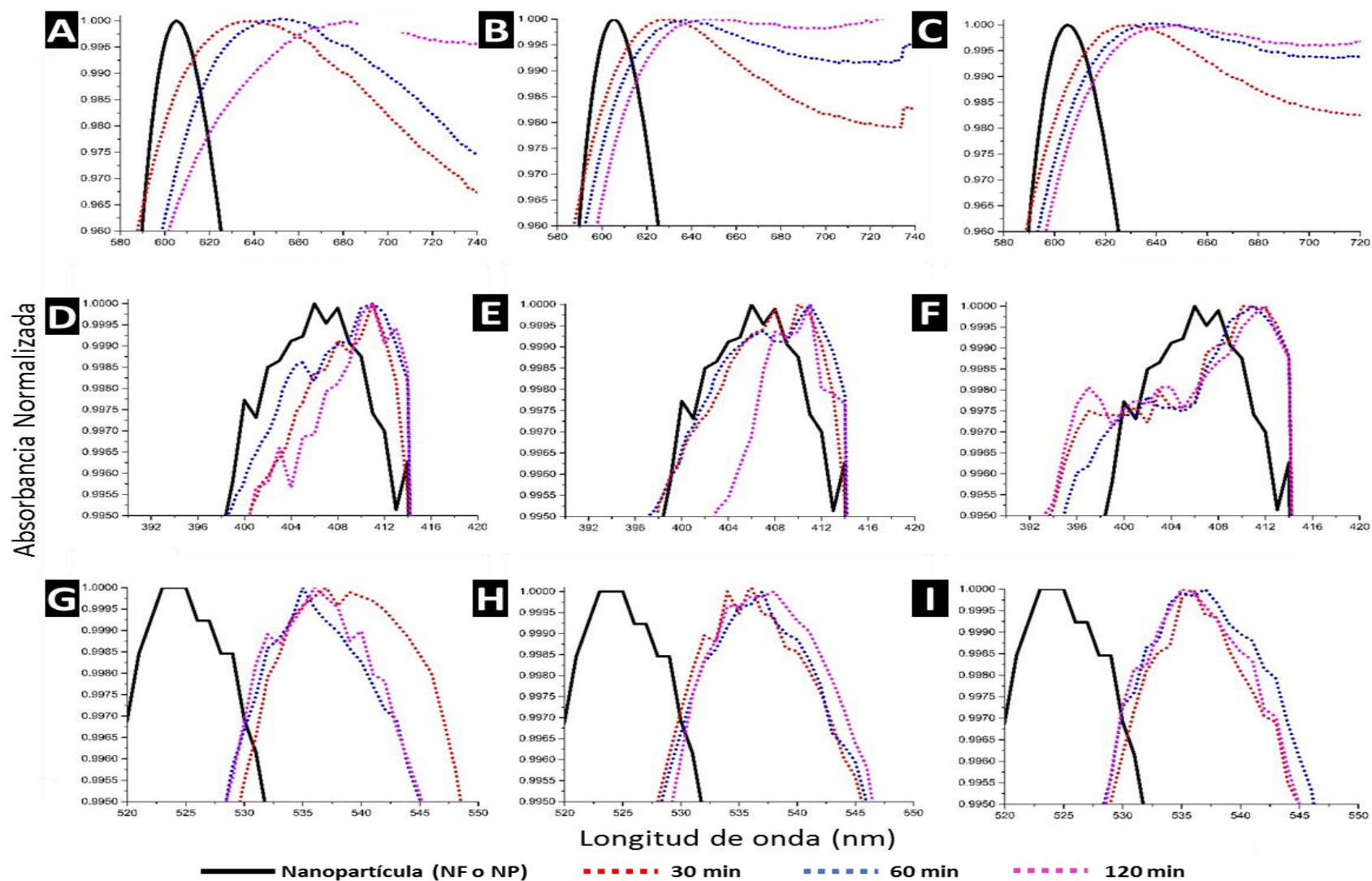


Figura 27 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (3 repeticiones).

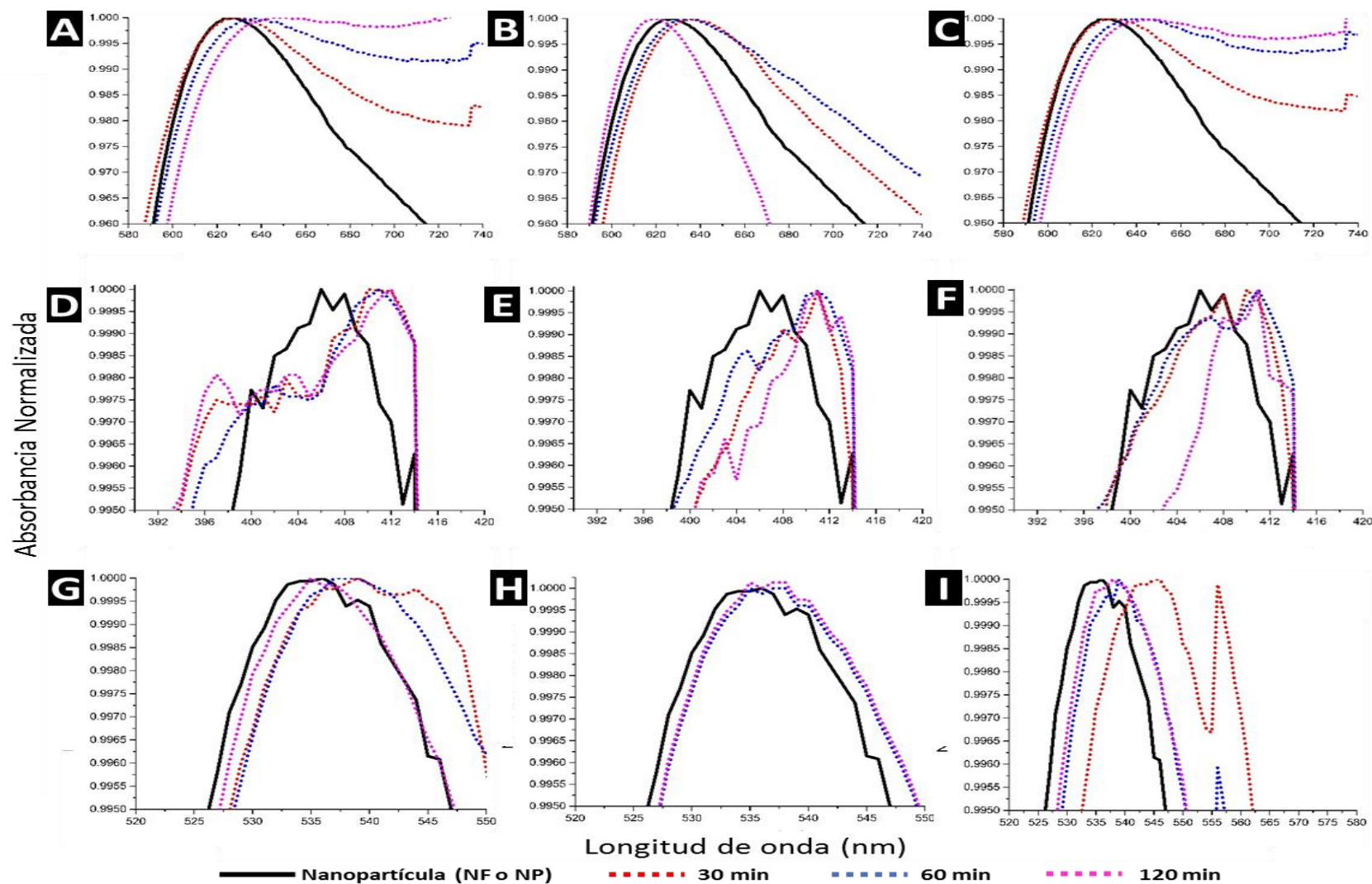


Figura 28 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (3 repeticiones).



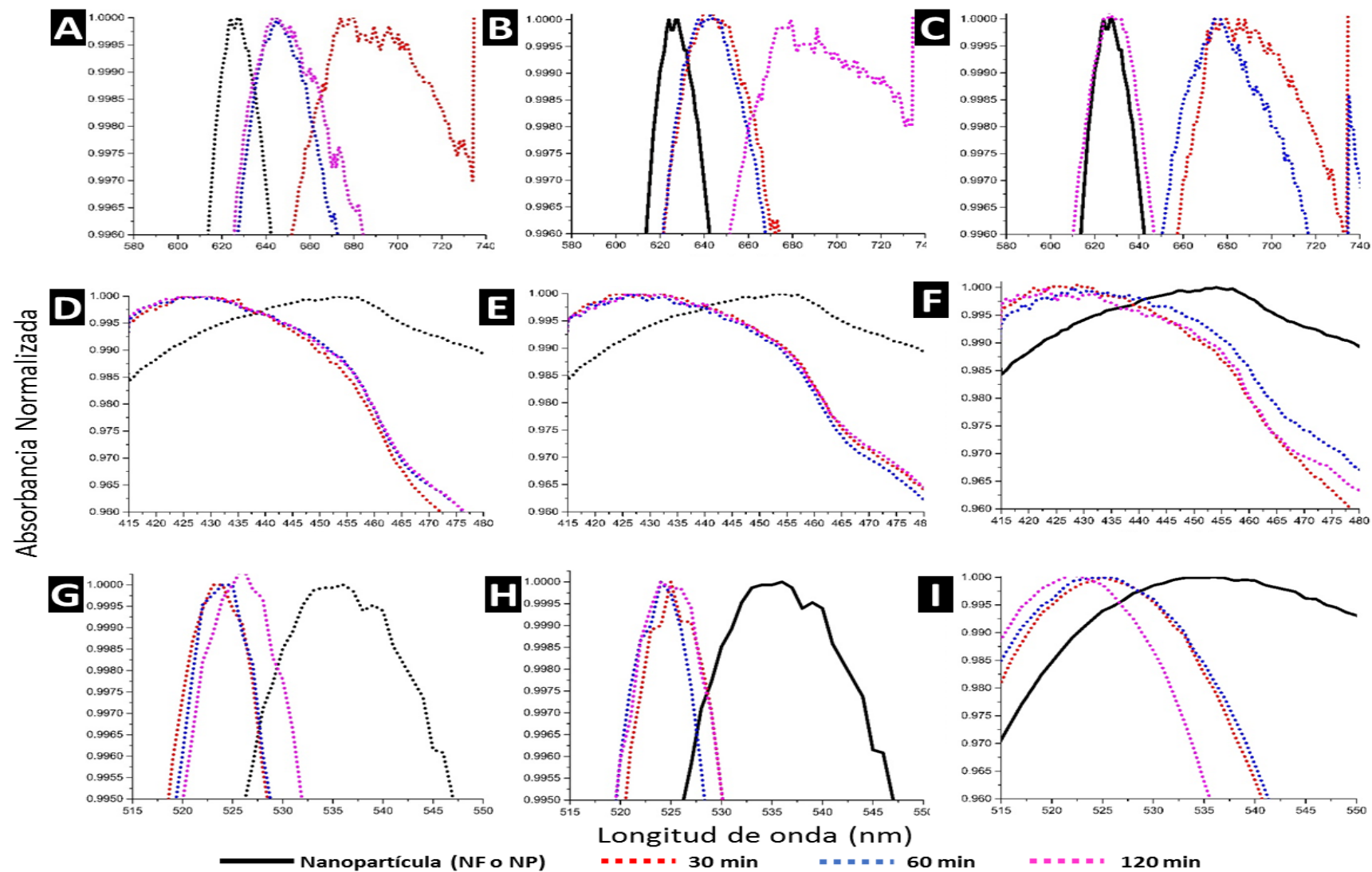


Figura 29 UV-vis análisis para evaluar la especificidad hacia el RSV por las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) en presencia de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (3 repeticiones).

De la misma manera, los experimentos se llevaron a cabo con las mismas condiciones utilizando la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, para las nanopartículas no funcionalizadas (Figura 34), nanopartículas funcionalizadas (Figura 35) y nanopartículas funcionalizadas-RSV (Figura 36).

Para el experimento de cobre no existió un cambio considerable con respecto al desplazamiento del LSPR en los sistemas de nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas en contacto con la bacteria, pero cuando las nanopartículas funcionalizadas estaban en contacto con la bacteria y el RSV se mostró un desplazamiento que aumentaba a medida que se incrementaba la cantidad de bacteria.

Esto es similar para los experimentos de plata, pero cuando la nanopartículas funcionalizadas se prueban con el RSV y la bacteria, existe un desplazamiento del LSPR aunque no se percibe una relación directa con la cantidad de bacteria. Los experimentos de oro no muestran desplazamiento para las nanopartículas no funcionalizadas, pero si existe cuando se prueba los experimentos con las nanopartículas funcionalizadas con y sin el virus RSV, para ambos, los desplazamientos son similares a las 3 diferentes concentraciones de la bacteria .



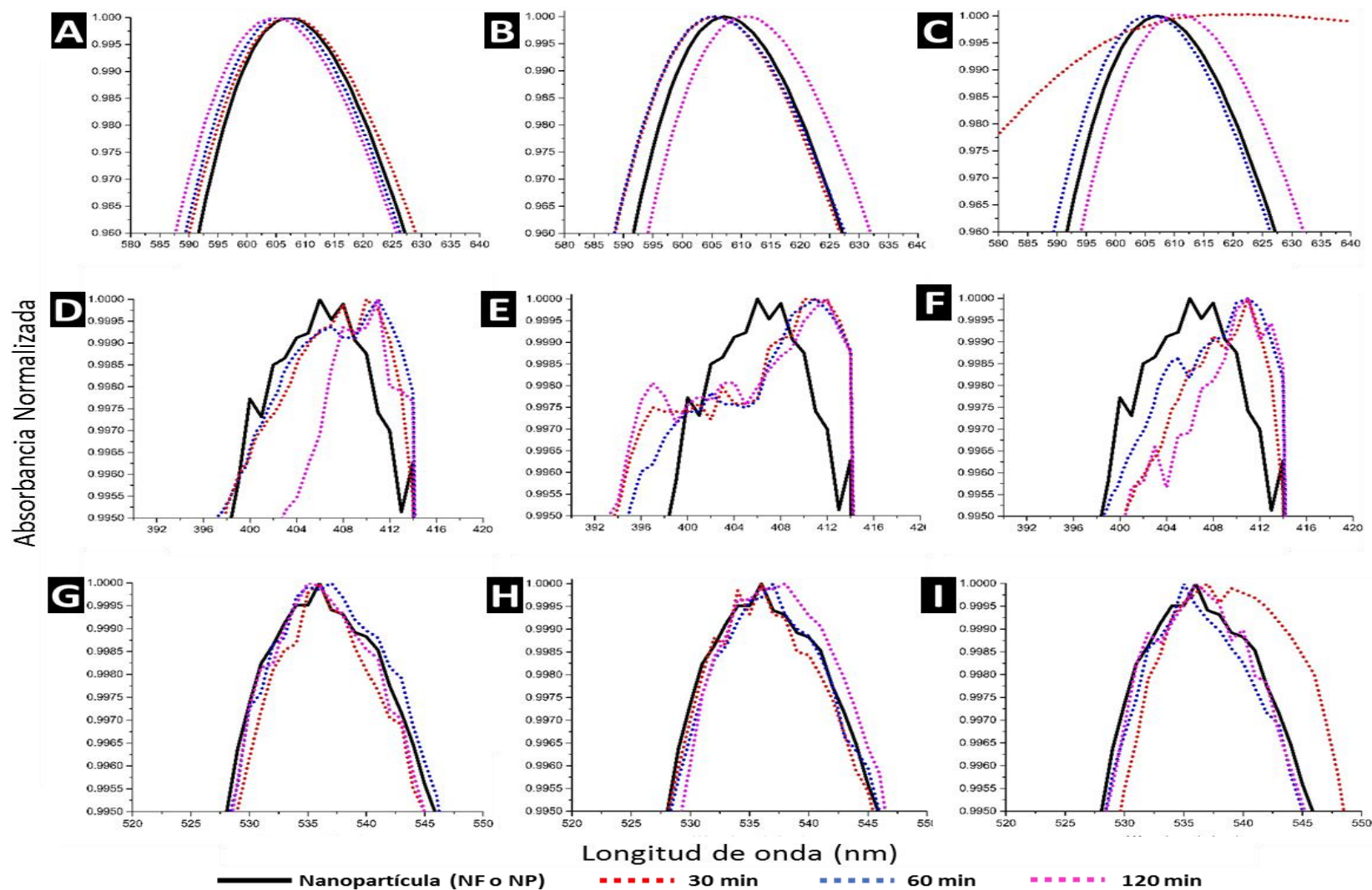


Figura 30 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia *P. aeruginosa* (3 repeticiones).

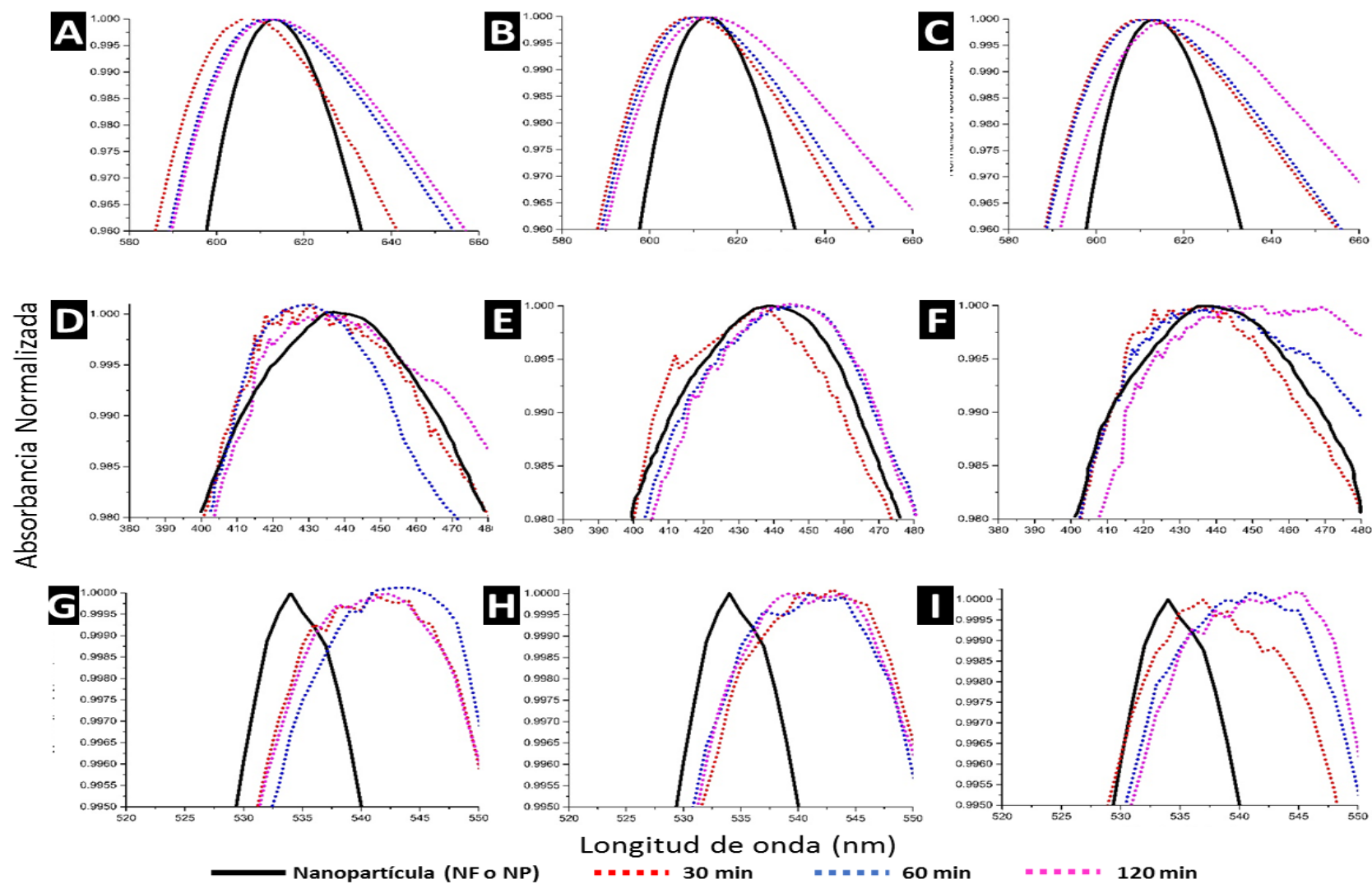


Figura 31 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia *P. aeruginosa* (3 repeticiones).

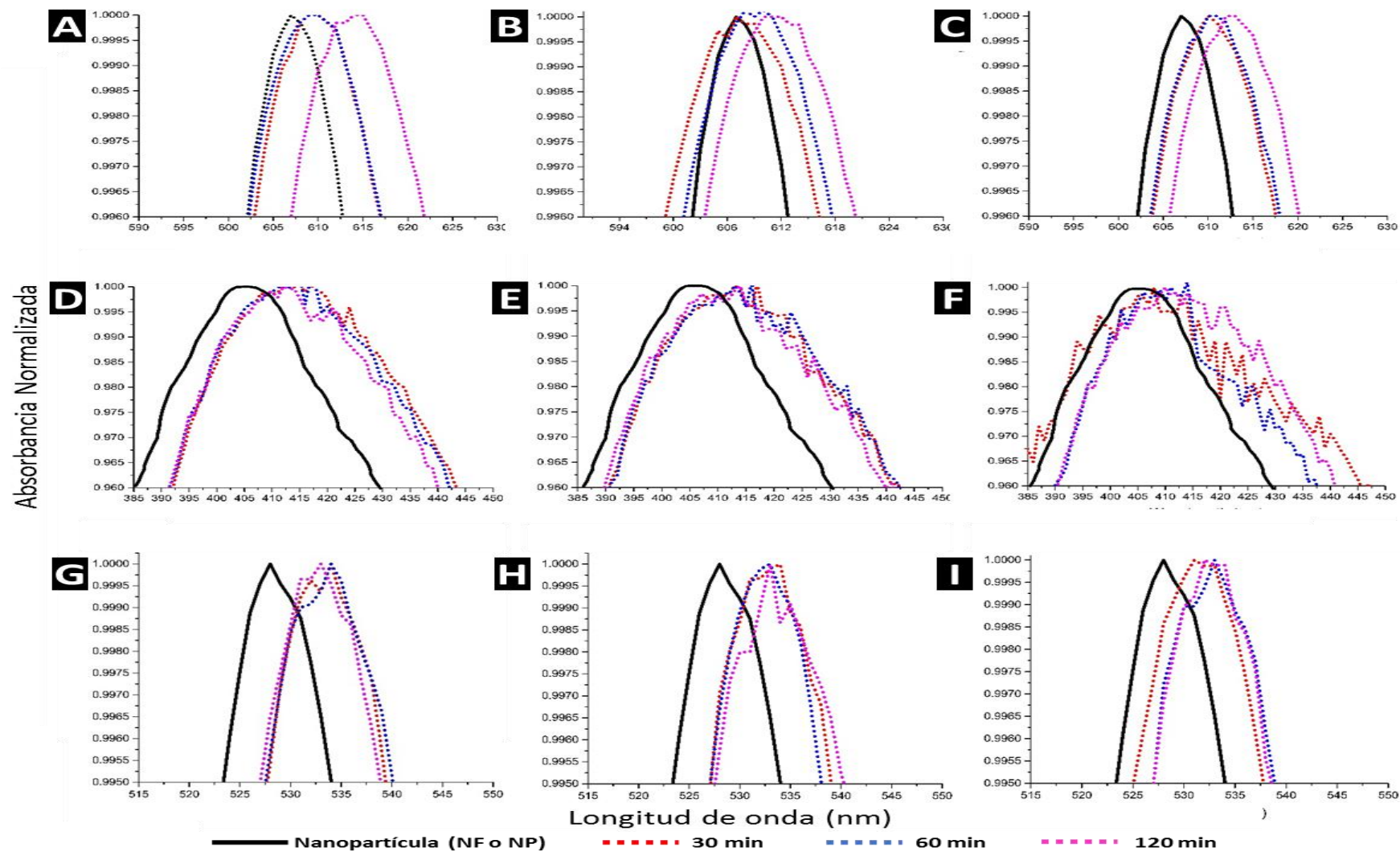


Figura 32 UV-vis análisis para evaluar la especificidad hacia el RSV por las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) en presencia de *P. aeruginosa* (3 repeticiones)..

Los experimentos fueron ahora sometidos a la interacción con un virus similar al RSV: el *Adenovirus*. La interacción de las nanopartículas funcionalizadas con *Adenovirus* en ausencia y presencia de RSV se muestra en la Figura 37 y 38, respectivamente.

El experimento de cobre para las nanopartículas no funcionalizadas, muestran un desplazamiento negativo en la cantidad más baja y media del virus externo y un cambio positivo para la cantidad más alta; para el mismo experimento, pero ahora utilizando las nanopartículas funcionalizadas, los desplazamientos son muy pequeños o incluso nulos para todas las cantidades del *Adenovirus* en los 3 sistemas de cobre, plata y oro.

En la interacción utilizando las nanopartículas funcionalizadas con el RSV y el virus externo, el experimento de cobre muestra desplazamientos del LSPR para las 3 cantidades del *Adenovirus*, solo en la cantidad alta de este virus su desplazamiento es menor en comparación a las otras dos cantidades. Para la plata no existen desplazamientos significativos en las 3 cantidades del virus externo. Para el oro, existen desplazamientos del LSPR, sin embargo no existe un patrón en relación a la cantidad del *Adenovirus*.

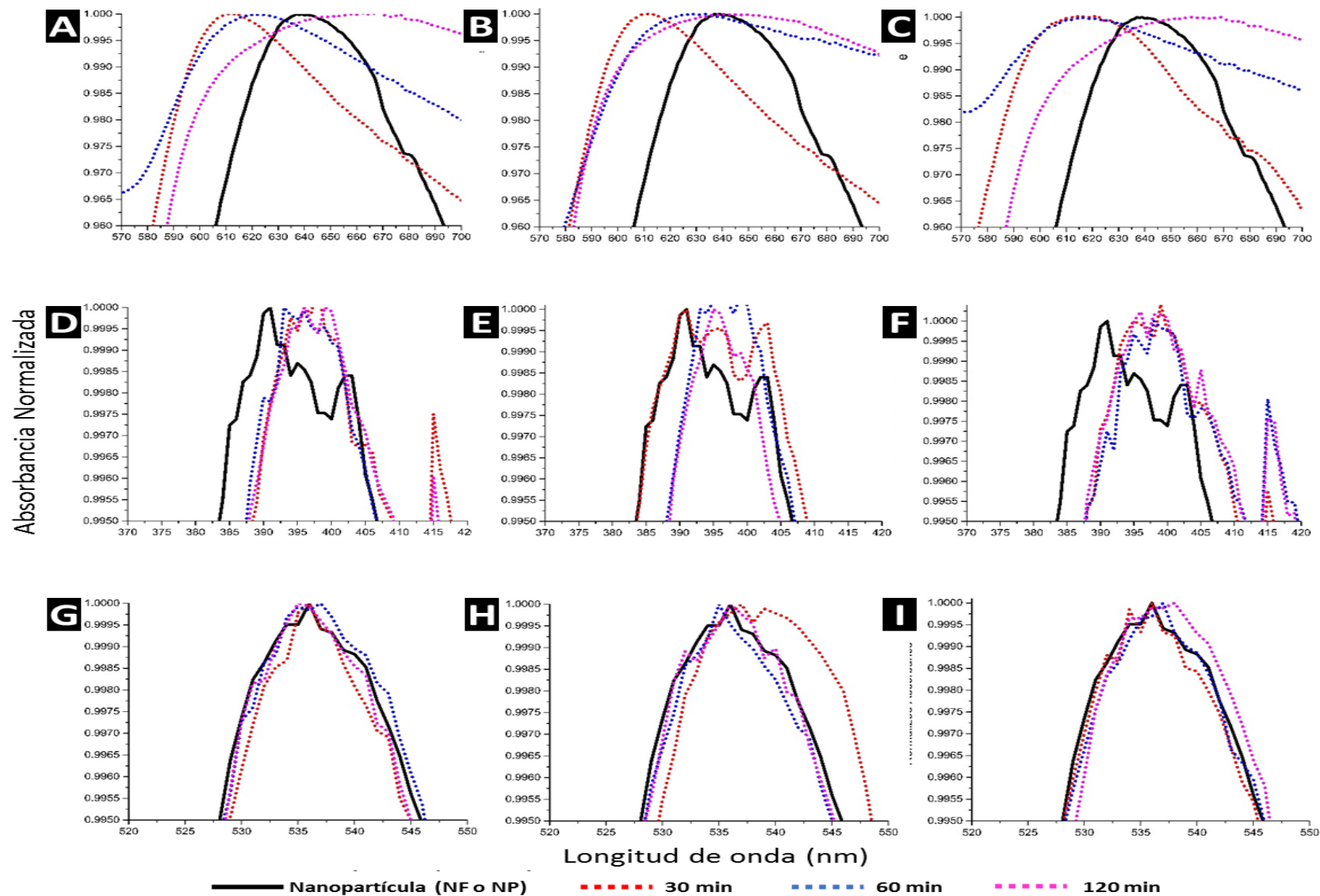


Figura 33 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia Adenovirus (3 repeticiones).



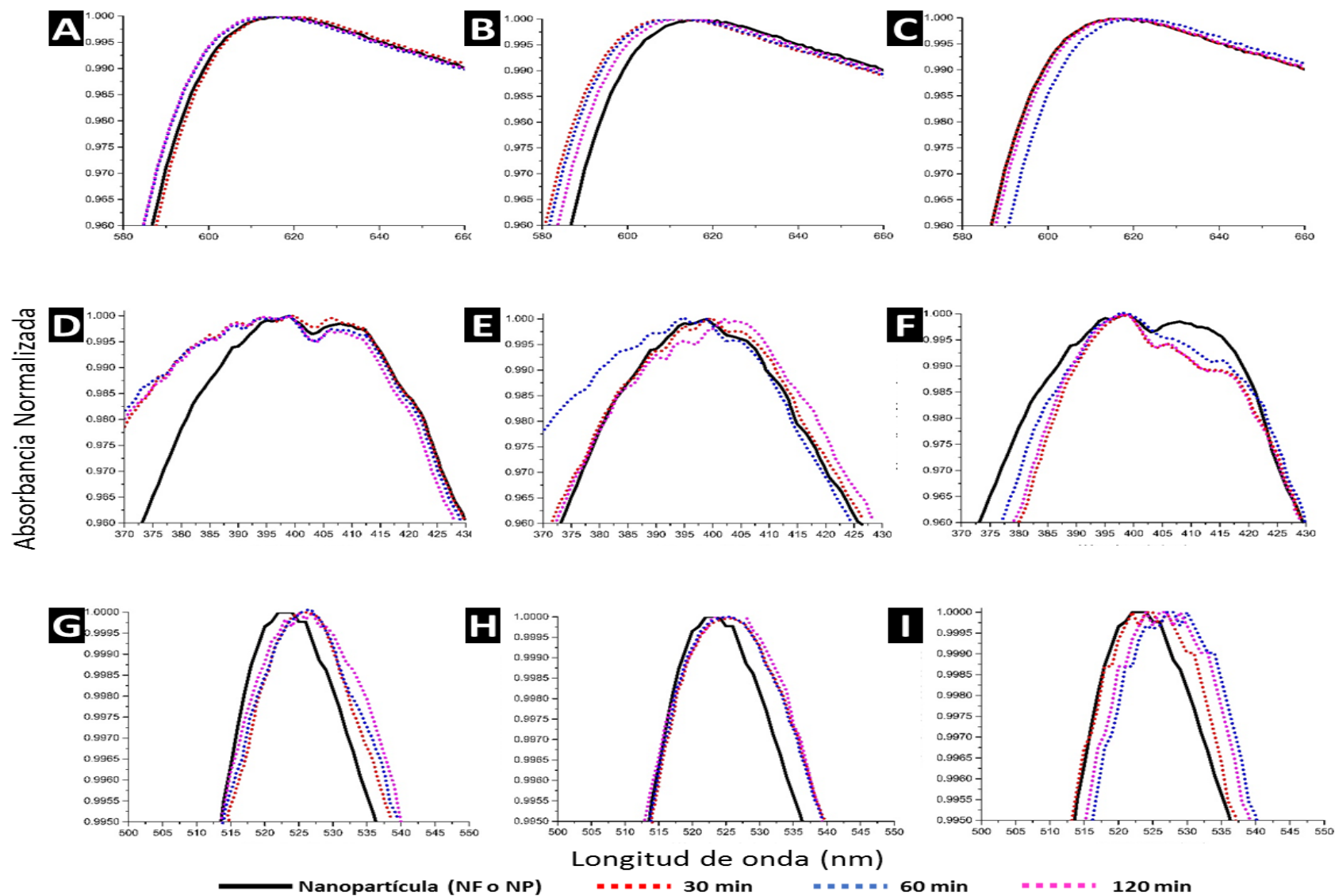


Figura 34 Análisis UV-vis para evaluar la reactividad cruzada las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) hacia *P. aeruginosa* (3 repeticiones).

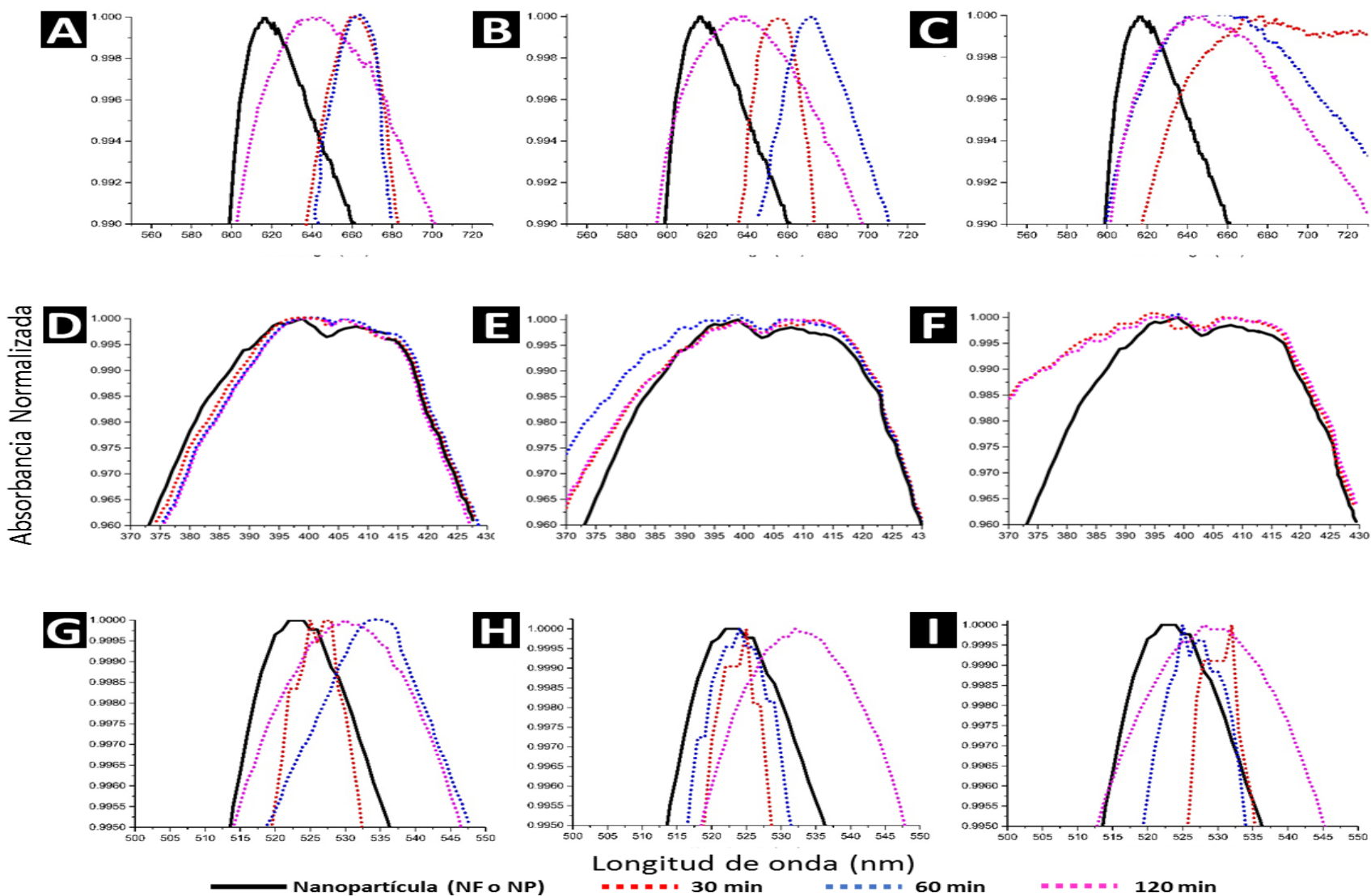


Figura 35 UV-vis análisis para evaluar la especificidad hacia el RSV por las nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) en presencia de Adenovirus (3 repeticiones)..

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 5.1 Discusión de resultados para los experimentos con L-cisteína

La síntesis de las nanopartículas metálicas utilizando a la L-cisteína como agente reductor y estabilizante no pudieron realizarse para los 3 sistemas. Para el sistema de cobre, el LSPR característico de las nanopartículas de dicho metal no se observó en el espectro excepto por las absorciones propias de la molécula de cisteína (340-360 nm).

Para el sistema de plata sucede lo mismo que con el de cobre, no existe absorción característica del LSPR de la plata, inclusive para ninguna de sus diferentes morfologías, la gran absorción que existe cuando se utiliza una concentración alta de plata para los 3 tiempos diferentes de reacción, podría relacionarse a una morfología específica de la plata, sin embargo, estos resultados no pudieron repetirse para los estudios posteriores.

Este problema puede relacionarse a lo investigado por Khan *et al.* En sus experimentos ellos encontraron que al no agregar N<sub>2</sub> al sistema, las nanopartículas de plata utilizando L-cisteína no podían sintetizarse, en cambio al agregar este compuesto y sellar el sistema se obtenían las nanopartículas, siendo comprobado por la aparición del LSPR



de las nanopartículas esféricas de plata. Aunque este experimento fue realizado para nuestros sistemas, no pudo obtenerse ninguna nanopartícula (cobre y/o plata) debido a que nuestro sistema no puede ser sellado como el de Khan *et al.* dado que los experimentos son expuestos a radiación microondas en un equipo convencional.

Para el sistema de oro, se pudo sintetizar con éxito las nanopartículas de oro, solo para los experimentos con concentración de 10 mM para los 3 tiempos diferentes, el LSPR característico que se observó fue el de las nanopartículas esféricas. El experimento que se escogió para futuros experimentos fue el de la concentración alta con un tiempo bajo (1 min).

El éxito de la síntesis en comparación a los sistemas de plata y cobre es que el ion  $\text{Au}^{3+}$  (presente en el sistema como  $\text{AuCl}_4^-$ ) tiene un potencial redox menor que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ag}^+$ , esto permite que la síntesis de las nanopartículas de oro sea realizada en condiciones normales en comparación a los otros dos iones.

El análisis FESEM (Figura 11) para la muestra seleccionada de las nanopartículas de oro (3 min en MW y 10 mM de  $\text{Au}^{3+}$ ) muestra la presencia de nanopartículas que están debajo de los 100 nm, sin embargo, existen aglomerados que superan este tamaño. Esto se debe a que la cisteína presente en la superficie de la nanopartícula de oro interactúa con otra molécula de cisteína presente en la superficie de otra nanopartícula para así formar cúmulos de nanopartículas. El análisis por EDS (Figura 12) muestra que estos cúmulos están compuestos principalmente por el elemento de interés.

La funcionalización de las nanopartículas de oro utilizando un anticuerpo policlonal fue observada utilizando la técnica de UV-vis. En el espectro mostrado en la Figura 13 se puede observar que el LSPR característico de las nanopartículas de oro aumenta su

desplazamiento al rojo conforme aumenta la concentración del anticuerpo policlonal. Para la concentración más baja, el desplazamiento es muy pequeño, al aumentar la concentración del anticuerpo en el sistema al doble, el desplazamiento aumenta a 20 nm. Este desplazamiento vuelve a duplicarse al duplicar la concentración del anticuerpo (utilizando 10  $\mu$ L), este desplazamiento es de aproximadamente 40 nm con respecto al LSPR de las nanopartículas de oro. Estos desplazamientos se deben a la cantidad de anticuerpo que queda funcionalizado sobre la superficie de las nanopartículas, los aumentos consecutivos del desplazamiento del LSPR se deben a que al aumentar la concentración del anticuerpo del sistema se aumenta la probabilidad o la cantidad disponible de que el anticuerpo quede funcionalizado en la nanopartícula. Cabe destacar que el experimento utilizando 10  $\mu$ L de anticuerpo se escogió para los futuros experimentos de la detección del RSV para la interacción con las nanopartículas funcionalizadas.

La distribución del tamaño de partícula (Figura 14) para las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas de oro, muestra que existen tamaños arriba de los 100 nm. Como se mencionó anteriormente estos tamaños mayores a 100 nm se atribuyen a aglomerados en el sistema, cabe destacar que el análisis FESEM comprueba que existen tamaños menores a este tamaño. Para las nanopartículas funcionalizadas la distribución del tamaño aumenta al doble. Se ha estudiado ampliamente que los anticuerpos forman aglomerados, esto puede repetirse en nuestro sistema, formando así cúmulos en el mismo.

Esto puede ser comprobado mediante el análisis de potencial zeta (Figura 15). En este análisis se comprueba que el potencial de las nanopartículas no funcionalizadas es de

-33 mV, relacionado a su alta estabilidad y el de las funcionalizadas aumenta a -18 mV afín a la disminución de su estabilidad. Esto nos permite inferir que esta poca estabilidad se debe a la presencia de aglomerados como se mostró en el análisis por DLS.

La detección del virus RSV se realizó utilizando las nanopartículas funcionalizadas de oro y se manejó como control a las nanopartículas no funcionalizadas. La Figura 41 representa el promedio de los desplazamientos del LSPR a las diferentes cantidades del virus RSV. Para los 30 min (Figura 41 A) se puede observar que los desplazamientos del plasmón de las nanopartículas no funcionalizadas son mayores en comparación a las nanopartículas funcionalizadas. Una explicación del porqué del desplazamiento del LSPR de las nanopartículas no funcionalizadas, es que al momento de estar en contacto con la solución donde se encuentra el RSV, éstas interactúan con otros compuestos químicos que alteran el campo del sistema de las nanopartículas provocando un cambio del LSPR. La Figura 40 muestra la solución donde se encuentra el RSV, el color rosado es debido al *buffer* que se encuentra en la solución. También se encuentran células humanas (provenientes del medio de cultivo) en las cuales el RSV se incubó.



Figura 36 Solución utilizada para los experimentos que contiene el RSV.

Para los 60 min (Figura 41 B) el desplazamiento de las nanopartículas funcionalizadas aumenta significativamente y éste es mayor que el de las nanopartículas funcionalizadas, sin embargo, el error para las tres cantidades de RSV es de aproximadamente el total del promedio del desplazamiento, esto es importante porque, aunque el promedio sea ascendente, el error nos indica que la variación entre experimentos es muy grande. Éste error disminuye a los 120 min y se mantiene un promedio ascendente, sin embargo, para los 500 y 1000 PFU el error es de aproximadamente 25 nm (para un sentido) representando aún un error grande para una detección. El desplazamiento del LSPR para las nanopartículas no funcionalizadas disminuye considerablemente al aumentar la concentración del RSV.

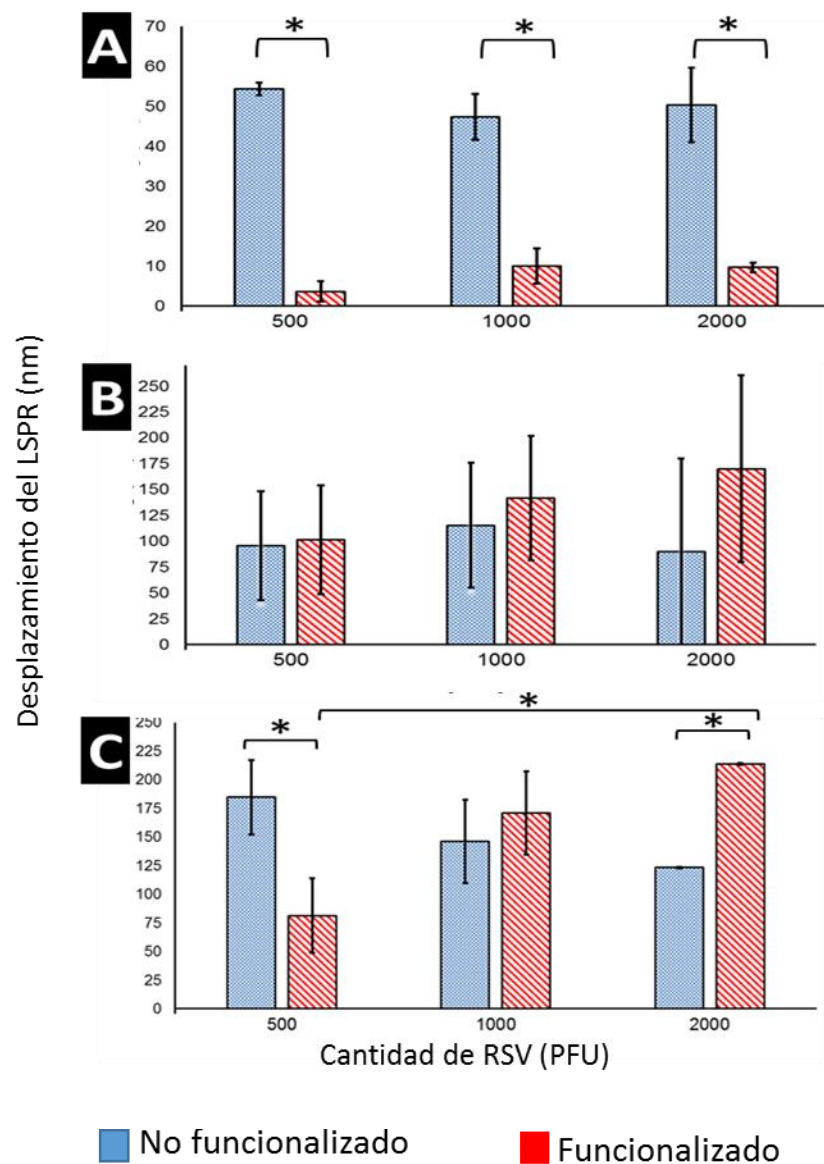


Figura 37 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para las nanopartículas funcionalizadas de oro a A) 30 min, B) 60 min y C) 120 min. El símbolo (\*) representa la significancia a  $p < 0.05$

## 5.2 Discusión de resultados para los experimentos utilizando alginato de sodio.

La síntesis de las nanopartículas de cobre, plata y oro es evidenciada utilizando la técnica UV-vis. Para la síntesis de las nanopartículas de cobre se puede observar que al utilizarse la concentración alta y media del ion metálico y colocarse a 2 minutos en MW

se obtienen dos absorciones características (600 nm) a los LSPR de las nanopartículas de cobre, debido a la forma del plasmón (aumenta y disminuye en forma proporcional), el experimento a 2 min de reacción con una concentración de 10 mM fue elegido para futuros experimentos.

En el sistema de plata, a concentraciones de 10 mM para todos los tiempos de reacción se obtuvo el plasmón característico (400 nm) de las nanopartículas de plata esféricas, también se obtuvo para el experimento de menor concentración a 2 min. Teniendo esta información, es difícil de inferir si los experimentos son dependientes de la concentración del ion metálico o del tiempo, es importante mencionar que 3 min de reacción provocaba la aparición de partículas (visibles a simple vista) de color negro. Esto puede ser indicativo que, a los 3 min, el exceso de alginato podría sufrir una descomposición debido a las altas temperaturas de la reacción. Al tener 1 min de reacción probablemente el tiempo es muy corto para que exista la suficiente cantidad de nanopartículas sintetizadas para las concentraciones media y baja.

En el sistema de oro solo la alta concentración a un tiempo de 1 min obtuvo la respuesta característica de las nanopartículas esféricas de oro. Sin embargo, este plasmón es ancho en el rango de longitud de onda, lo que puede dificultar su uso como sensor plasmónico. Aunque el LSPR no es óptimo para su uso como sensor plasmónico, se utilizó con el fin de comparar los 3 sistemas metálicos.

El análisis por FESEM (Figura 19) muestra que, para el sistema de cobre, se presentan tamaños que van desde las nanopartículas hasta arriba de los 100 nm. Para los sistemas restantes, al igual que el cobre, existen partículas que también superan los 100 nm, sin embargo, esto se debe a la presencia de aglomerados en el sistema donde, al igual que

en el apartado de la utilización de L-cisteína, los grupos funcionales del alginato presente en la superficie de las nanopartículas, interactúan entre sí para dar la formación de aglomerados. Además, los análisis de mapeo elemental por EDS (Figura 20) comprueban que estas estructuras están formadas por los metales de las sales precursoras. Más adelante, se profundizará en la explicación de los tamaños de las partículas no funcionalizadas por las técnicas de DLS y TEM.

La Figura 22A muestra los espectros UV-VIS para la funcionalización de las nanopartículas de cobre: el LSPR de las nanopartículas no funcionalizadas se encuentra a 620 nm, siendo una longitud de onda característica para este tipo de nanopartículas. De la misma manera, las nanopartículas no funcionalizadas de plata (Figura 22B) y oro (Figura 22C) teniendo absorciones plasmónicas concordes con las nanopartículas esféricas de cada metal.

La funcionalización utilizando el anticuerpo policlonal se llevó a cabo en las mismas condiciones para todas las nanopartículas. La interacción de cualquier molécula o compuesto químico con la nanopartícula se representa por el desplazamiento del LSPR del sistema; esto es evidente cuando se utilizan diferentes concentraciones de Ab para las tres nanopartículas. Además, el uso de sensores basados en el LSPR de la nanopartícula, necesita tener una buena definición (para observar fácilmente el desplazamiento). En el caso de ésta funcionalización, es importante recordar que la adición de cualquier estructura química o biológica a la superficie de nanopartículas aumentará el tamaño y por lo tanto la anchura de la LSPR. Dicho esto, la funcionalización de las nanopartículas de cobre y oro (Figura 22A) tuvo éxito utilizando 5  $\mu$ L de Ab y 10  $\mu$ L en el caso de las de nanopartículas de plata.

Además, se puede observar que la interacción entre las diferentes concentraciones del Ab y las nanopartículas es diferente. Esto está relacionado con la naturaleza de cada sistema, por ejemplo, el uso de 10  $\mu\text{L}$  de Ab (4 mg/mL) para la funcionalización de las nanopartículas de cobre, cambió la forma y la anchura del LSPR debido al alto grado de enlazamiento del Ab a la superficie de la nanopartícula.

En otros casos, como en el sistema de las nanopartículas de oro, la misma cantidad de Ab (10  $\mu\text{L}$ ) no cambia la longitud de onda del LSPR porque la naturaleza es diferente (tal como el tamaño) [151] y proporciona una condición diferente para el enlazamiento del Ab. En este volumen, la concentración de Ab es superior a los otros dos volúmenes de 2.5  $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$ , y esto es un problema cuando se realiza la funcionalización, esto es debido a que a una alta concentración existen otros tipos de interacciones, tales como la unión Ab-Ab lo que podría provocar una competencia con la funcionalización de la nanopartícula.

Los experimentos de la distribución del tamaño de partícula (Figura 23) revelan tamaños superiores a 100 nm para todos los sistemas. Esto podría indicar que estas nanopartículas (específicamente las no funcionalizadas) tienen tamaños más grandes, pero los informes [152-154] sobre la absorción plasmónica para estas nanopartículas metálicas relacionan el tamaño nanométrico a una absorción específica. Nuestras nanopartículas muestran una absorción plasmónica similar a los informes de la literatura evidenciando que los tamaños arriba de 100 nm vistos en FESEM y DLS son correspondientes a los aglomerados. Cabe destacar también, que el alginato es un polímero, en el cual las nanopartículas podrían estar colocadas en una matriz compleja, aumentando así el tamaño incluso más que real.



En TEM (Figura 21), los experimentos de plata y oro muestran tamaños por debajo de los 100 nm y también se comprueba la presencia de aglomerados. Esto apoya la idea que los tamaños mostrados en la distribución del tamaño de partícula se relacionan con aglomerados que podrían formarse por las interacciones químicas entre el alginato presente en la superficie de las nanopartícula.

Para el cobre, el tamaño de las estructuras en TEM eran de aproximadamente 250 nm, similar a la distribución de tamaño de partícula y también el análisis microscópico muestra estructuras pequeñas alrededor y sobre las partículas. Además, observar que las estructuras arriba de 100 nm tienen una circunferencia no definida se puede inferir que también existe aglomeración en el sistema. También es importante mencionar que la longitud de onda del plasmón superficial del sistema de cobre está en concordancia con la presentada en literatura para nanopartículas de este metal.

Las nanopartículas funcionalizadas (Figura 23 B, E y G) son más grandes en tamaño que las nanopartículas no funcionalizadas para los tres sistemas. Este cambio de tamaño de las nanopartículas puede estar relacionado con la funcionalización de anticuerpo. La interacción entre estas entidades podría aglomerar aún más el sistema, y esto es evidente en los experimentos de potencial zeta.

El potencial zeta (Figura 24) para las nanopartículas no funcionalizadas de cobre (-17,2 mV) se relaciona con la inestabilidad de este sistema y podría explicar el proceso de aglomeración que se mencionó anteriormente. Además, las respectivas nanopartícula funcionalizadas muestran un potencial positivo de 10 mV en representación de la misma inestabilidad. Las nanopartículas de plata y de oro tienen un potencial arriba de -35 mV, esto representa que estos sistemas tienen una buena estabilidad y se relaciona con los

tamaños pequeños a diferencia de las nanopartículas de cobre; sin embargo, las nanopartículas funcionalizadas para nanopartículas de plata y oro muestran un potencial menor a -20 mV y representa la inestabilidad del sistema atribuida a la aglomeración (como se observa en la distribución de los tamaños de partículas).

La conjugación del anticuerpo demuestra que para los sistemas de plata y oro se tuvo una menor cantidad de anticuerpo conjugado, que fue del 82% y 55% respectivamente, pero el cobre se obtuvo una conjugación de 92%. Estos valores juegan un papel muy importante, debido a que una mayor cantidad de anticuerpo conjugado, ayudaría a que el virus RSV sea detectado adecuadamente, debido a que existen mayores puntos de interacción entre el antígeno del RSV y los anticuerpos presentes en las nanopartículas funcionalizadas. Posteriormente se hablará sobre los límites de detección y cuantificación sobre estos tres sistemas, siendo los más bajos para el sistema funcionalizado de cobre, el cual tiene una alta cantidad de anticuerpo funcionalizado.

También existe una relación entre el potencial zeta y la conjugación del anticuerpo. Entre más positivo sea el potencial zeta para las nanopartículas funcionalizadas, existe una mayor cantidad de anticuerpo conjugado a las nanopartículas metálicas. Esto puede explicarse mediante la presencia de los grupos funcionales que tiene el anticuerpo como se muestran en la Figura XX. En el anticuerpo existen 3 principales entidades y grupos funcionales, el grupo mayoritario amino ( $-NH_3$ ), los puentes S-S y los carbohidratos.

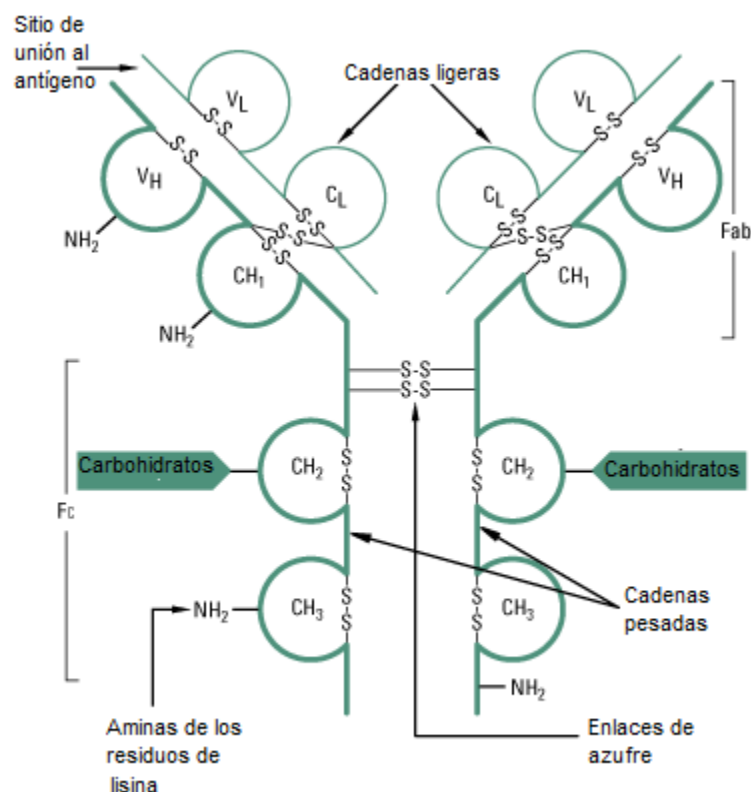


Figura 38 Estructura química del anticuerpo.

Al tener en la solución un pH de 6.58, el grupo amino cambia a estar protonado. Esta protonación puede convertir la carga neta del anticuerpo en positiva, lo cual al añadirse a la nanopartícula no funcionalizada aumentará el potencial zeta negativo de éstas a uno más positivo. Al relacionarlo con la conjugación del anticuerpo, se puede inferir que las nanopartículas funcionalizadas de cobre tienen un potencial muy positivo (en comparación a los otros sistemas) debido a la alta conjugación del anticuerpo.

La interacción entre las nanopartículas funcionalizadas (y no funcionalizadas, como control) y las diferentes cantidades de RSV en un tiempo de interacción de 30 min se resume en la Figura 42. Los experimentos utilizando nanopartículas de cobre muestran que el cambio se asocia a la presencia del RSV, mientras que el experimento de control

(nanopartículas no funcionalizadas) no mostraron cambios significativos. El nivel de significación entre los experimentos del control y las nanopartículas funcionalizadas, donde la  $H_0$  (hay un desplazamiento utilizando nanopartículas de cobre sin funcionalización) es rechazada. Se observa que existe cambio significativo entre las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas a 2000 PFU para el sistema de plata, mientras que, para las nanopartículas de cobre, los cambios significativos se observaron para todas las concentraciones de RSV. Observando los resultados de cobre a 2000 PFU se distingue que disminuye el desplazamiento del LSPR.

También a este tiempo se puede apreciar el alto error en el sistema de plata para los experimentos funcionalizados de cobre, con ello se infiere que, a los 30 min, no es tiempo suficiente para la unión efectiva entre el Ab y el RSV en el caso del cobre, además la existencia de interacciones de los experimentos control de plata con otras sustancias en el sistema, permiten un desplazamiento del LSPR inclusive mayor que el de las nanopartículas funcionalizadas con el RSV dando información de que, podrían existir interacciones diferentes no relacionadas al RSV en ambos sistemas.

En el sistema de oro, para las nanopartículas funcionalizadas, se exhibe un mayor cambio a 2000 PFU; es casi el doble del desplazamiento observado en 1000 PFU. En el caso del experimento utilizando una cantidad de 500 PFU, el desplazamiento es casi cero y esto podría estar relacionado con una interacción incompleta entre las nanopartículas de oro y el RSV. Es importante señalar que a 500 PFU los experimentos control exhiben una absorción negativa como los experimentos control de las nanopartículas de cobre.

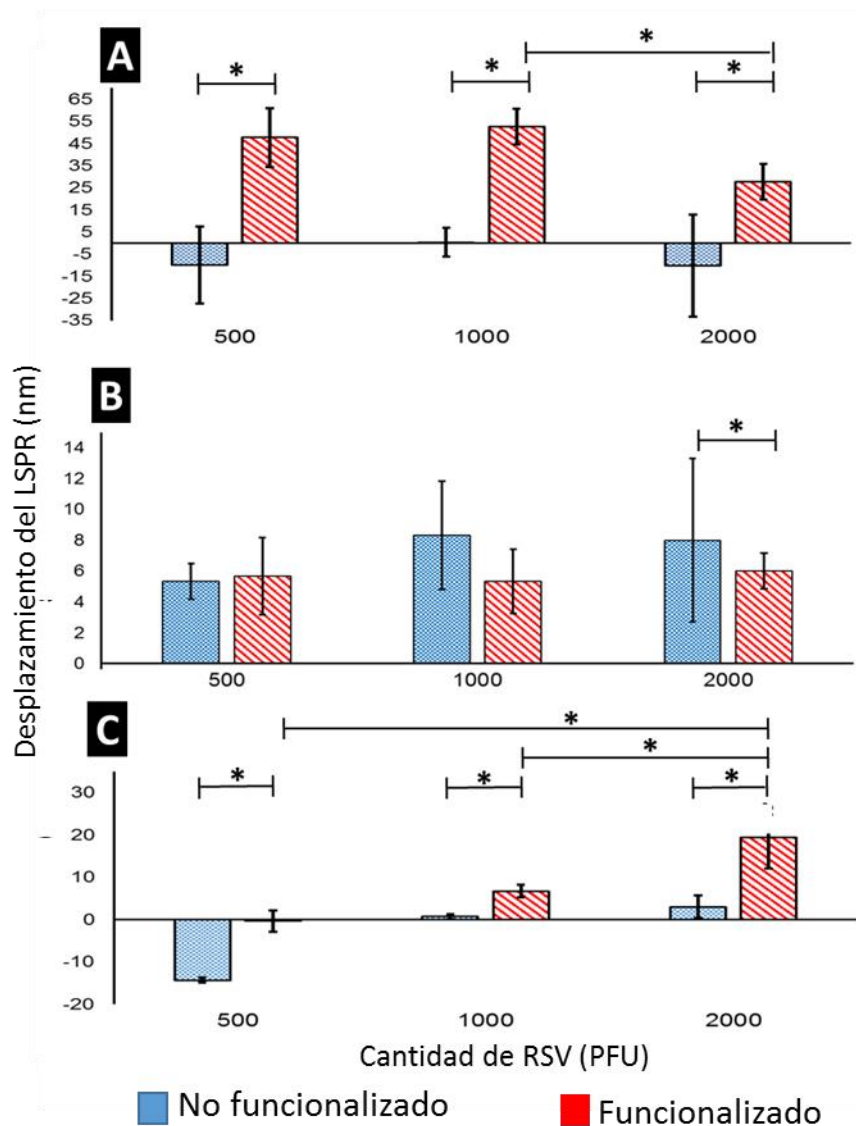


Figura 39 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para A) cobre, B) plata y C) oro a 30 min. El símbolo (\*) representa la significancia a  $p < 0.05$ .

Un desplazamiento del LSPR negativo o nulo se observó para casi todos los experimentos control para las nanopartículas de cobre y oro. Cabe destacar que, en teoría, estos experimentos no presentan un desplazamiento porque no hay compuesto que permita la interacción con el RSV. Esto se puede explicar observando la teoría de los biosensores utilizando LSPR, independientemente de que, si la nanopartícula esté

funcionalizada o no, se debe tener en cuenta tres tipos de linealidad en estos biosensores:

- a) Linealidad entre la contribución de las interacciones moleculares y la “*index signature*”, llamado linealidad intrínseca.
- b) Linealidad entre “*index signature*” y el desplazamiento de la resonancia (LSPR).
- c) Linealidad adicional (en realidad no linealidad) asociada con el LSPR.

Cuando se utilizan nanopartículas plasmónicas como biosensores, el LSPR muestra una no linealidad más alta debido a un aumento de la amortiguación y una gran “*signature index*”. Ahora bien, si las nanopartículas no funcionalizadas presentan una linealidad del tipo b, la señal no reflejaría una cantidad proporcional de desplazamiento e incluso puede provocar un cambio negativo [155].

En 60 min (Figura 43), las nanopartículas funcionalizadas de cobre tienen un patrón diferente, específicamente a 2000 PFU donde el cambio se incrementa en comparación con 30 min y los valores a 500 y 1000 PFU son similares entre los dos tiempos. Esto apoya la idea de que se necesita más tiempo en concentraciones más altas para tener una buena interacción entre el RSV y las nanopartículas funcionalizadas.

Las nanopartículas de plata muestran desplazamientos similares en todos los experimentos, con un aumento mínimo observado en 1000 y 2000 PFU. Es importante señalar en los experimentos control, la disminución de desplazamiento en comparación con 30 min, informando sobre las interacciones presentes entre las nanopartículas no funcionalizadas en el sistema, esto podría deberse a enlaces débiles que con el paso del

tiempo desaparecerían, observándose una disminución del desplazamiento del LSPR. Además, las nanopartículas de plata exhiben un desplazamiento similar en todas las cantidades de RSV para 60 min, lo que indica que el sistema está saturado y no hay margen de que el RSV interactúe con la nanopartícula funcionalizada.

Las nanopartículas funcionalizadas de oro siguieron el mismo patrón en 2000 PFU: un aumento del desplazamiento, apoyando así la hipótesis de que se requiere más tiempo de interacción para cantidades más altas de RSV, estabilizando así el sistema. Esto se puede comprobar fácilmente en los experimentos a 120 min (Figura 44), donde los errores disminuyen en todas las muestras para los tres sistemas.

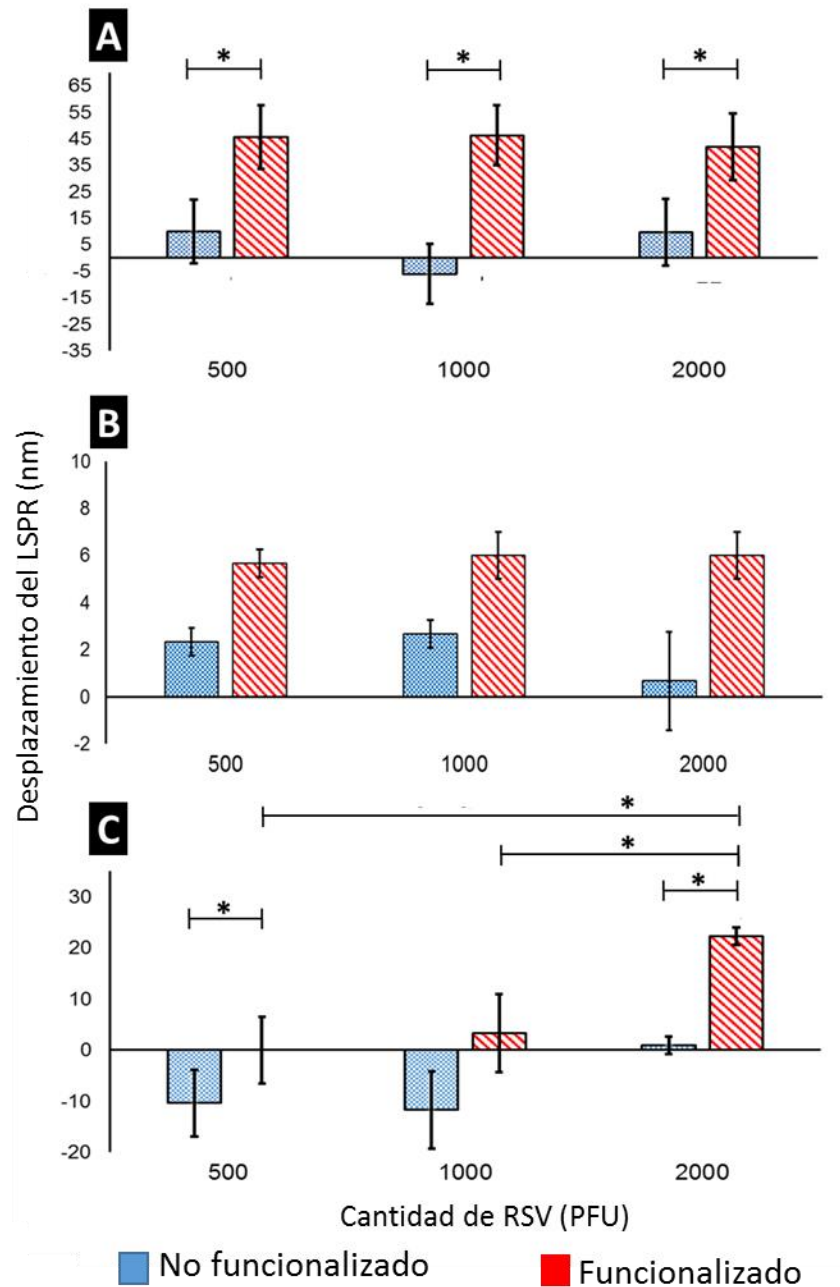


Figura 40 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para A)

cobre, B) plata y C) oro a 60 min. El símbolo (\*) representa la significancia a  $p < 0.05$

También, para los 120 min, las nanopartículas funcionalizadas de cobre, el desplazamiento a 2000 PFU aumenta respecto a los otros dos tiempos, siendo una prueba más de que los experimentos con altas cantidades de RSV necesitan un tiempo



mayor para su interacción. En el caso de los experimentos de plata, las nanopartículas funcionalizadas muestran desplazamientos similares para los 3 tiempos.

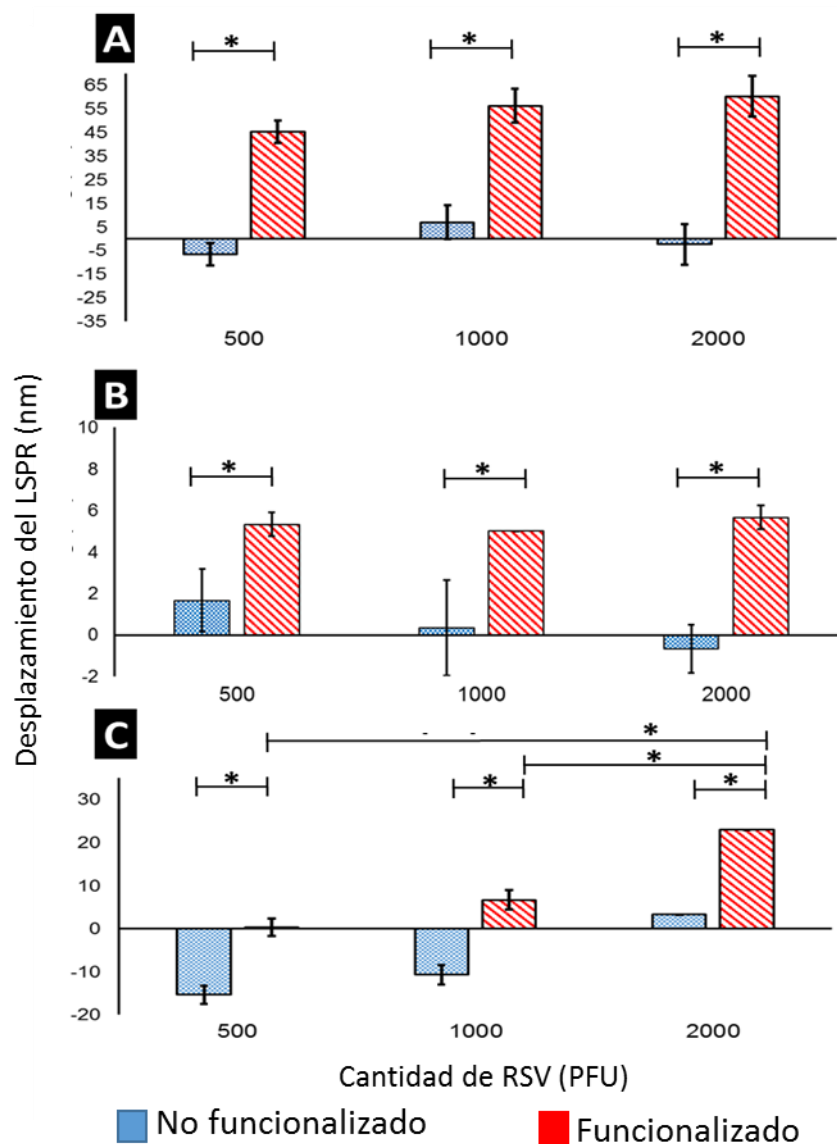


Figura 41 Diagrama del desplazamiento del LSPR a diferentes cantidades de RSV para A) cobre, B) plata y C) oro a 120 min. El símbolo (\*) representa la significancia a  $p < 0.05$ .

La Figura 45 resume todos los cambios los experimentos, teniendo en cuenta el valor logarítmico las cantidades de RSV contra el desplazamiento promedio del LSPR.

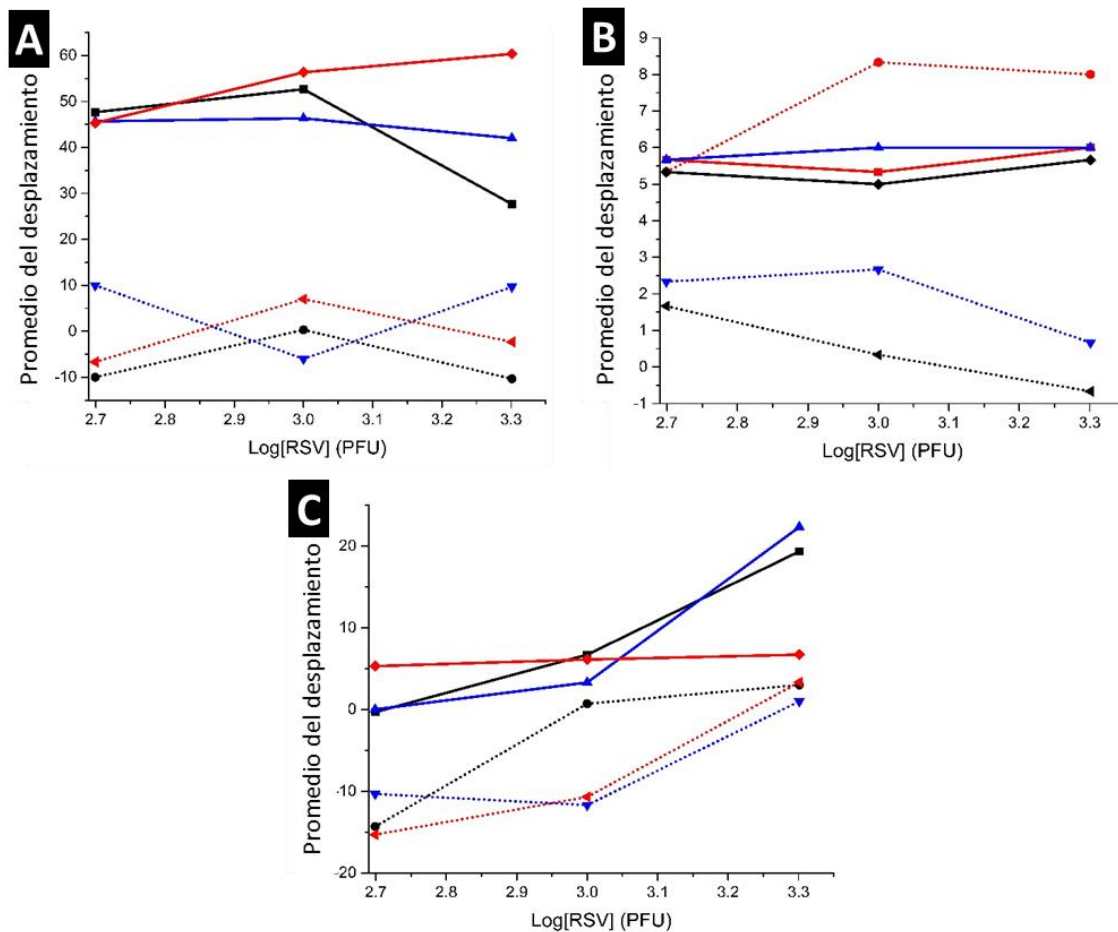


Figure 42 Gráfico que representa las interacciones entre el valor logarítmico de la cantidad de RSV contra el desplazamiento promedio del LSPR para A) de cobre, B) plata y C) oro. Línea completa representa el experimento de nanopartículas funcionalizadas y la línea de punteada para las no funcionalizadas.

Los experimentos (basados en las nanopartículas funcionalizadas) de cobre y oro muestran una mejor linealidad a 120 min (Ver Tabla 4), para los experimentos de plata el único valor aceptable fue a 60 min.

Tabla 4 Valores de la R de Pearson a diferentes tiempos para los experimentos utilizando las nanopartículas funcionalizadas.

<b>NPs Funcionalizadas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>R Pearson</b>
<b>Cu</b>	30 min	-0.76
	60 min	-0.79
	120 min	0.97
<b>Ag</b>	30 min	0.5
	60 min	0.87
	120 min	0.5
<b>Au</b>	30 min	0.98
	60 min	0.93
	120 min	0.97

Los límites de detección y cuantificación (Ver Tabla 5) son mejores en los experimentos de cobre. El experimento de oro no muestra un buen valor de LOD o LOQ en comparación con los experimentos de cobre y plata, sin embargo, tiene una linealidad convincente y su uso como detector de RSV debería de probarse a concentraciones mayores.

Tabla 5 Valores de LOD y LOQ para los experimentos con la mejor linealidad.

<b>NPs funcionalizadas</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>LOD (PFU)</b>	<b>LOQ (PFU)</b>
Cu	120	2.4	14
Ag	60	7	385
Au	120	209	633

En los experimentos de especificidad con la bacteria *S. enterica*, (Figura 46) la disminución del desplazamiento del LSPR en casi un 50% para las nanopartículas funcionalizadas de cobre en contacto con el RSV y la bacteria, esto se relaciona a la presencia del microorganismo externo que dificulta la interacción entre el RSV y las

nanopartículas funcionalizadas. Para las nanopartículas de cobre funcionalizadas estando solo en contacto con la bacteria, muestran un pequeño desplazamiento del LSPR, indicando que a medida que aumenta la concentración de la bacteria, la especificidad de las nanopartículas funcionalizadas de cobre para con el RSV baja.

Los experimentos control (nanopartículas no funcionalizadas en contacto con la bacteria) muestran un incremento de desplazamiento cuando la concentración de la bacteria aumenta; aunque no se puede atribuir una interacción específica con la bacteria debido a su desplazamiento se puede atribuir a interacciones con otros compuestos en el sistema o de que el alginato presente en la superficie de las nanopartículas, pueda interactuar con la bacteria de diferentes maneras, como enlaces débiles entre los grupos funcionales para ambos compuestos.

Los experimentos de plata y oro (Figura 46 B y C) muestran patrones similares. Tienen pequeños y/o nulos desplazamientos del LSPR para las nanopartículas funcionalizadas y la interacción con *S. enterica*, siendo algo apropiado ya que puede explicar la especificidad al sistema, sin embargo, cuando estos experimentos están en contacto con el RSV, no pueden reproducir el mismo desplazamiento del LSPR, siendo incluso negativos.

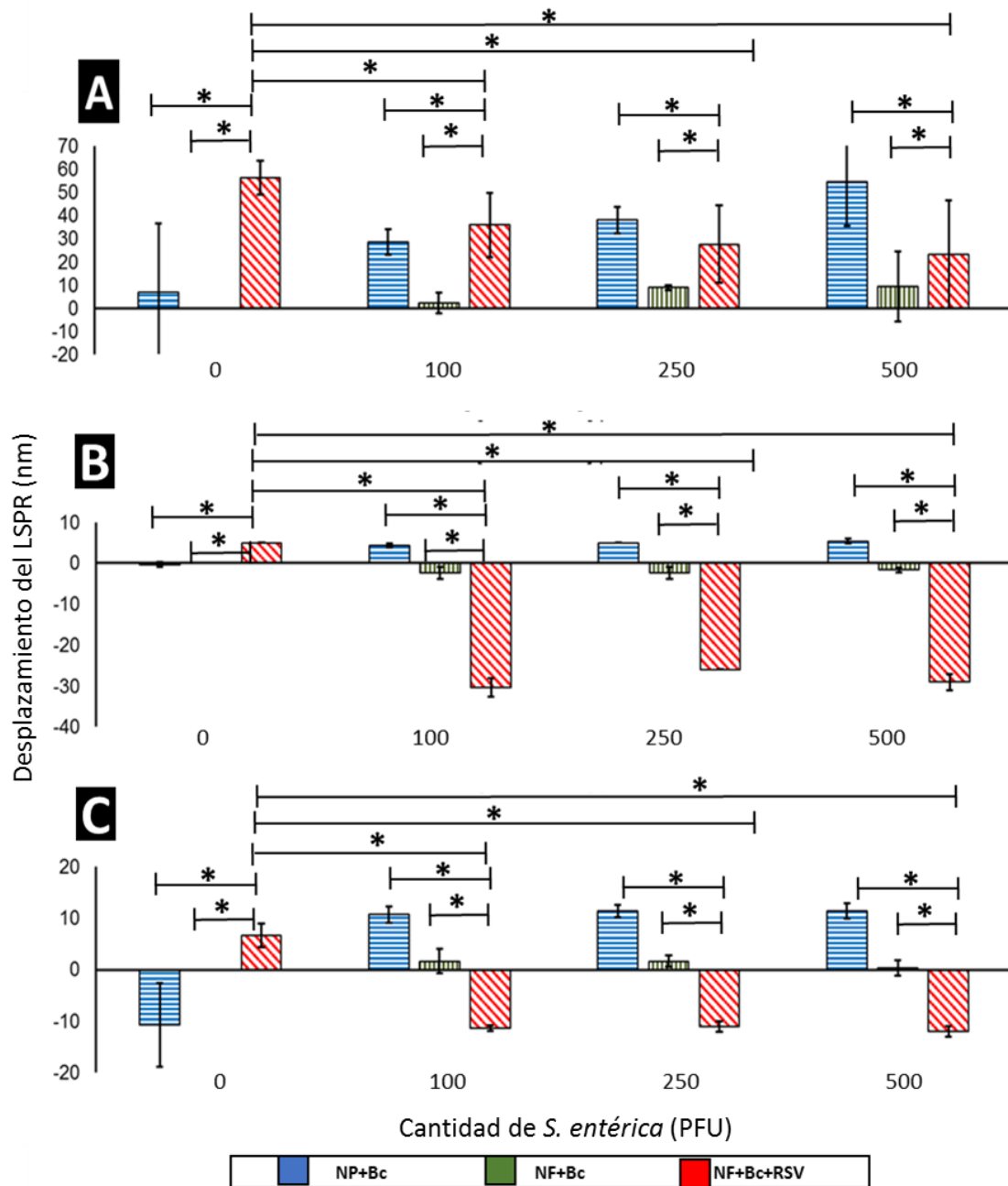


Figure 43 Esquema sobre los experimentos de reactividad cruzada y especificidad para A) cobre, B) plata y C) oro con Salmonella enterica ser. typhimurium. NP y NF representan los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas respectivamente y Bc para la bacteria.

Para la especificidad utilizando *P. aeruginosa* (Figura 47) la interacción entre las nanopartículas funcionalizadas de cobre y los microorganismos (RSV y bacteria) no muestra ningún desplazamiento considerable, al igual que los experimentos de *S. enterica*, esto se relaciona a que la interacción entre el RSV y las nanopartículas funcionalizadas no es apropiada. Además, los tamaños más grandes de la bacteria en comparación con el virus podrían desempeñar un papel importante en estos experimentos, como un impedimento a la interacción entre los analitos de interés.

Los experimentos de plata y oro (Figura 47 B y C) no muestran ningún cambio en los experimentos control (nanopartículas no funcionalizadas con bacteria); sin embargo, las nanopartículas funcionalizadas de oro en contacto solo con la bacteria muestran un desplazamiento, y podría estar asociado a la interacción entre las nanopartículas funcionalizadas y la bacteria, teniendo poca especificidad. En el caso de los experimentos de plata, las nanopartículas funcionalizadas en contacto con la bacteria no mostraron desplazamiento; esto nos permite inferir que el desplazamiento asociado a la interacción de las nanopartículas funcionalizadas y la mezcla del virus con la bacteria externa es asociada solo con la interacción del RSV.

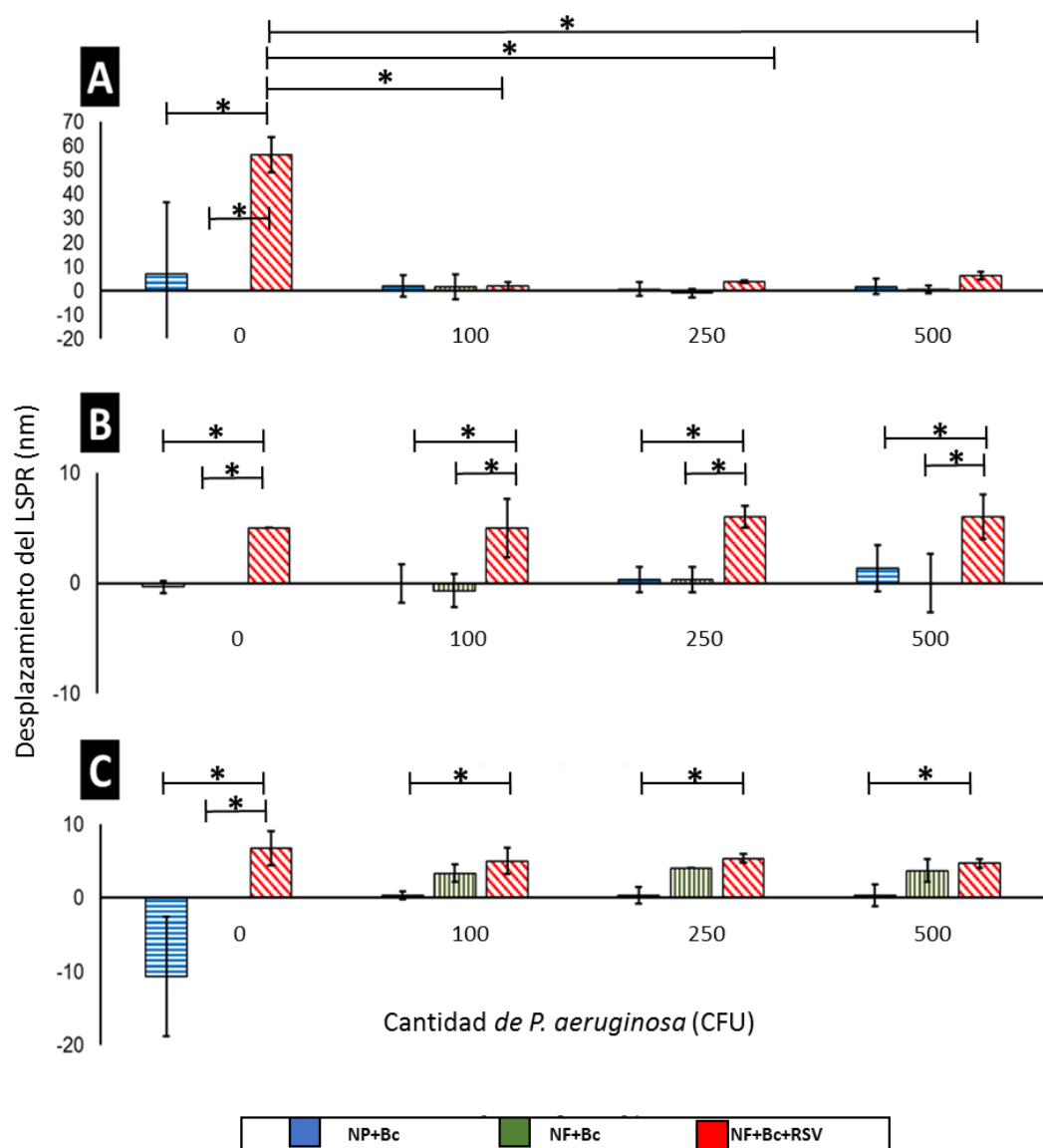


Figura 44 Esquema sobre los experimentos de reactividad cruzada y especificidad para A) cobre, B) plata y C) oro con *P. aeruginosa*. NP y NF representan los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas respectivamente y Bc para la bacteria.

El *Adenovirus* se utilizó para probar la especificidad para la detección de RSV (Figura 48). Las nanopartículas de cobre funcionalizadas no tienen una interacción al estar en contacto con el *Adenovirus* y puede explicar la especificidad total hacia el virus RSV. En cantidades de  $2.7 \times 10^4$  y  $5.5 \times 10^4$  PFU de *Adenovirus*, el desplazamiento del LSPR entre estas nanopartículas y la mezcla de RSV con *Adenovirus* es similar al desplazamiento en ausencia de *Adenovirus* (0 PFU), pero cuando se tiene la mayor concentración del virus externo, el desplazamiento se reduce en casi 50%. Como se ha explicado antes, esto puede estar relacionado con la presencia de una gran cantidad de *Adenovirus* que satura el sistema e interfiere con la interacción RSV y las nanopartículas funcionalizadas. También, es importante mencionar que la cantidad más grande de *Adenovirus* es mayor 100 veces a la cantidad del virus RSV, por lo que los resultados muestran la gran especificidad y robustez del sistema de detección de RSV en presencia del virus no específico.

En los experimentos de plata, las nanopartículas funcionalizadas sólo mostraron desplazamientos del LSPR cuando estaban en contacto con la cantidad más pequeña de *Adenovirus*. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas en contacto con el RSV-*Adenovirus* muestran un patrón inverso, cuando la cantidad del *Adenovirus* aumenta (comenzando desde la primera cantidad del virus), el desplazamiento disminuye. En la cantidad mayor del *Adenovirus*, el plasmón desaparece. Esta desaparición puede estar relacionada (como en el caso del cobre) a la gran cantidad presente del virus externo.

También se observa que, cuando las nanopartículas funcionalizadas están en contacto con el RSV y el *Adenovirus* en una cantidad de  $5.5 \times 10^4$  y  $2.7 \times 10^4$  PFU, los desplazamientos son mayores en comparación a cuando no hay ninguna presencia de



*Adenovirus*; los errores no muestran una anomalía en las lecturas de los experimentos, por lo que la única explicación es que este cambio es una propiedad intrínseca de las nanopartículas, y puede ser debido a la funcionalización (completa o no), modo de interacción, etc.

En el sistema de oro, las nanopartículas funcionalizadas en contacto con ambos virus presentan un desplazamiento similar cuando no existe ninguna cantidad de *Adenovirus*, sin embargo, los errores son muy grandes y los experimentos de las nanopartículas funcionalizadas en contacto solo con el *Adenovirus* demuestran desplazamientos por lo que no se puede inferir que este sistema es específico para el RSV y no podría funcionar en matrices complejas que contienen este u otros virus.

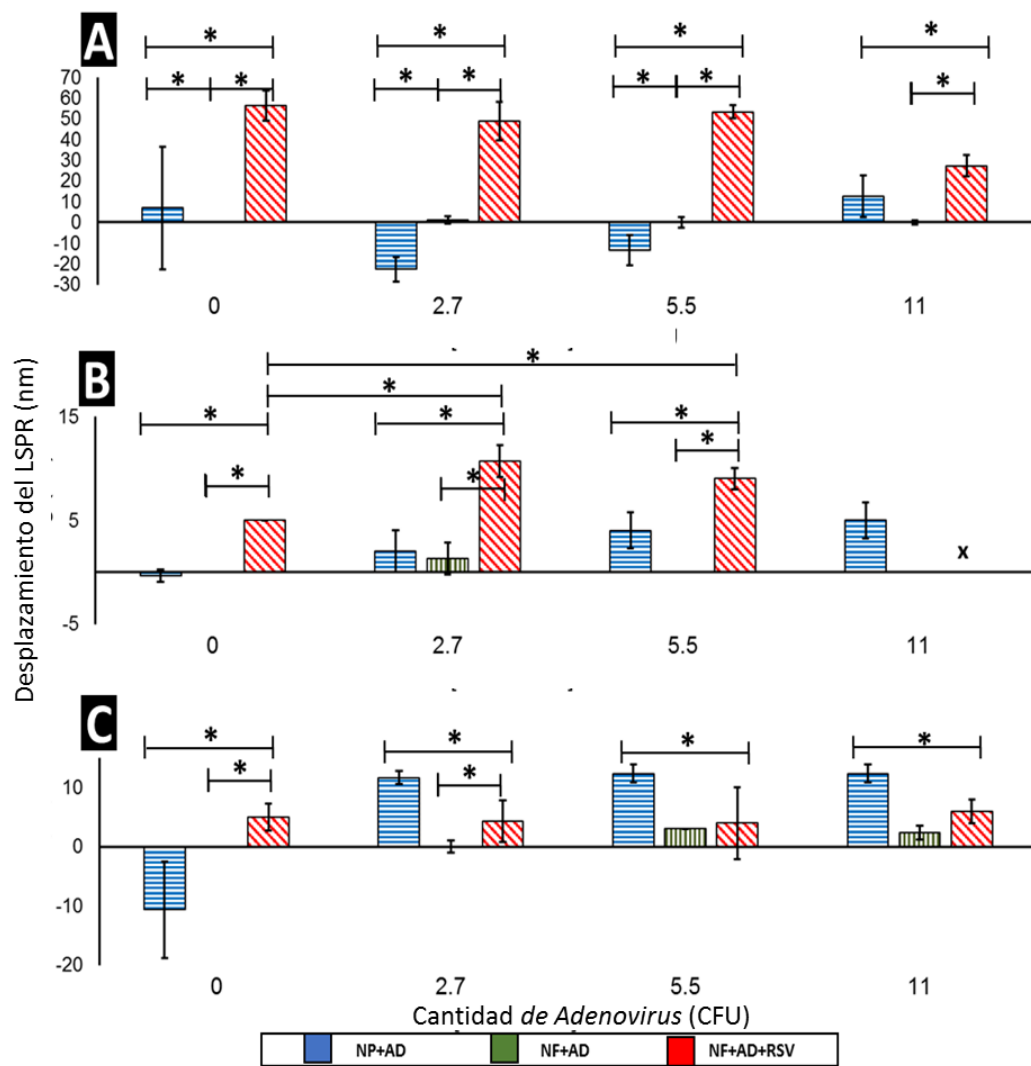


Figure 45 Esquema sobre los experimentos de reactividad cruzada y especificidad para A) cobre, B) plata y C) oro con Adenovirus. NP y NF representan los experimentos de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas respectivamente y AD para el Adenovirus.

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIONES**

Utilizando la técnica UV-vis fue posible demostrar la obtención de las nanopartículas de oro utilizando a la L-cisteína como agente reductor y estabilizante, además los análisis FESEM y EDS confirman la presencia de nanopartículas y aglomerados, los cuales están formados específicamente por el metal de interés.

También, por medio de las técnicas antes mencionadas fue posible demostrar la obtención de las nanopartículas metálicas utilizando alginato de sodio como agente reductor y estabilizante. Por medio de la técnica UV-vis se comprobó la presencia del LSPR característico de las nanopartículas de interés. El tamaño de partícula se obtuvo por medio FESEM y DLS demostrando la presencia de aglomerados en los 3 sistemas. La técnica EDS comprobó que estos aglomerados estaban conformados por los metales de respectivos para cada tipo de nanopartícula. La morfología esférica de los 3 sistemas se determinó por TEM, estando en concordancia con los resultados obtenidos de UV-vis.

El proceso de funcionalización fue exitoso para las nanopartículas de oro, en el caso de la síntesis con L-cisteína y de cobre, plata y oro para el alginato de sodio, utilizando un anticuerpo policlonal. Para éstos últimos, se determinó una conjugación del 92%, 82% y 52% para el cobre, plata y oro, respectivamente.

La detección del virus RSV utilizando nanopartículas funcionalizadas de oro sintetizadas por L-cisteína se realizó a diferentes tiempos, sin embargo, ningún experimento presentó resultados adecuados para su uso como detector plasmónico.

Para los sistemas funcionalizados utilizando alginato, los experimentos fueron exitosos basados en la linealidad fueron a 120 min, para cobre y oro y de 60 min para la plata para los sistemas de cobre, plata y oro, respectivamente, siendo dependientes del tiempo de interacción. Los límites de detección y cuantificación para las nanopartículas funcionalizadas de cobre fueron los más bajos de los tres sistemas.

La especificidad y reactividad cruzada para RSV en el sistema de alginato, tuvieron resultados favorables para el cobre en los experimentos con *Adenovirus* y *P. aeruginosa* para la plata.

Con base en los resultados de la detección RSV, la especificidad y los análisis estadísticos, las nanopartículas funcionalizadas de cobre con un tiempo de interacción de 120 min representan el mejor sistema para ser utilizado como sensor de RSV en comparación con los otros sistemas.

La hipótesis para la síntesis de las nanopartículas metálicas y su aplicación como sensores plasmónicos fue comprobada para el sistema alginato, sin embargo, para los experimentos donde se utiliza a la L-cisteína, no se cumple para los 3 sistemas, además, las nanopartículas sintetizadas (oro) no demuestran buenos resultados para ser consideradas como sensores plasmónicos.

## **6.1 Recomendaciones y trabajo futuro**

En la parte de síntesis, se pueden buscar nuevas concentraciones para observar la cantidad máxima que se pueden sintetizar utilizando los agentes reductores.

Desarrollar un estudio sobre la estabilidad y control del tamaño de partícula, para tener tamaños uniformes en el sistema.

En los experimentos de detección, se pueden realizar un mayor número de puntos y repeticiones con el fin de desarrollar una experimentación para su uso en pruebas clínicas.

Enfocar el estudio en el sistema de cobre-alginato, dado que los resultados son muy prometedores, compitiendo en límites de detección y cuantificación, además del bajo costo de producción.

Desarrollar un dispositivo (considerando las variables que implica el desarrollo) que pueda realizar la detección de este virus de una manera más sencilla, con el objetivo de aplicarse directamente en detección para pacientes.

## REFERENCIAS

1. Ehud Gazit, A.M., *Plenty of room for biology at the bottom: An introduction to bionanotechnology*. Second ed. 2013.
2. Mongillo, J., *Nanotechnology 101*. Vol. 1. 2007: GREENWOOD PRESS. 304.
3. Whitesides, G.M., *Nanoscience, nanotechnology, and chemistry*. Small, 2005. **1**(2): p. 172-9.
4. Sanders, M., et al., *An enhanced LSPR fiber-optic nanoprobe for ultrasensitive detection of protein biomarkers*. Biosens Bioelectron, 2014. **61**: p. 95-101.
5. Park, T.J., et al., *Development of label-free optical diagnosis for sensitive detection of influenza virus with genetically engineered fusion protein*. Talanta, 2012. **89**: p. 246-52.
6. Jiang, Z., et al., *Cell surface-based sensing with metallic nanoparticles*. Chem Soc Rev, 2015.
7. Voisin, V., et al., *Highly sensitive detection of molecular interactions with plasmonic optical fiber grating sensors*. Biosens Bioelectron, 2014. **51**: p. 249-54.
8. Bazak, R., et al., *Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015. **141**(5): p. 769-84.
9. Lee, K., et al., *Heparin immobilized gold nanoparticles for targeted detection and apoptotic death of metastatic cancer cells*. Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6530-6.
10. Wang, C.F., et al., *Dual-drug delivery by porous silicon nanoparticles for improved cellular uptake, sustained release, and combination therapy*. Acta Biomater, 2015. **16**: p. 206-14.
11. Lajunen, T., et al., *Light induced cytosolic drug delivery from liposomes with gold nanoparticles*. J Control Release, 2015. **203**: p. 85-98.
12. Haes, A.J., et al., *Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(7): p. 2264-2271.
13. Saleh, M., H. Soliman, and M. El-Matbouli, *Gold nanoparticles as a potential tool for diagnosis of fish diseases*. Methods Mol Biol, 2015. **1247**: p. 245-52.
14. Laboratory, S.a.l.M., *An illustration of Localized surface plasmon resonance (LSPR)*.
15. Hess, O., et al., *Active nanoplasmonic metamaterials*. Nat Mater, 2012. **11**(7): p. 573-84.
16. Khan, M.S. and V.R. Chaudhari, *Morphological effect on fluorescence behavior of silver nanoparticles*. J Fluoresc, 2014. **24**(3): p. 751-7.
17. Zhang, T., et al., *Synthesis of silver nanostructures by multistep methods*. Sensors (Basel), 2014. **14**(4): p. 5860-89.
18. Amendola, V., O. Bakr, and F. Stellacci, *A Study of the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation Method: Effect of Shape, Size, Structure, and Assembly*. Plasmonics, 2010. **5**(1): p. 85-97.
19. Zhao, Q., et al., *A reusable localized surface plasmon resonance biosensor for quantitative detection of serum squamous cell carcinoma antigen in cervical cancer patients based on silver nanoparticles array*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1097-104.
20. Rengan, A.K., et al., *Multifunctional gold coated thermo-sensitive liposomes for multimodal imaging and photo-thermal therapy of breast cancer cells*. Nanoscale, 2014. **6**(2): p. 916-23.

21. Wittenberg, N.J., et al., *Applications of SPR for the characterization of molecules important in the pathogenesis and treatment of neurodegenerative diseases*. Expert Rev Neurother, 2014. **14**(4): p. 449-63.
22. Lee, S.S. and L.P. Lee, *Noninvasive label-free nanoplasmonic optical imaging for real-time monitoring of in vitro amyloid fibrogenesis*. Nanoscale, 2014. **6**(7): p. 3561-5.
23. Suh, J.Y., et al., *Plasmonic bowtie nanolaser arrays*. Nano Lett, 2012. **12**(11): p. 5769-74.
24. Zhu, Z., et al., *Reusable three-dimensional nanostructured substrates for surface-enhanced Raman scattering*. Nanoscale Res Lett, 2014. **9**(1): p. 25.
25. Tabor, C., D. Van Haute, and M.A. El-Sayed, *Effect of orientation on plasmonic coupling between gold nanorods*. ACS Nano, 2009. **3**(11): p. 3670-8.
26. Kim, Y. and J. Cho, *Metal nanoparticle fluids with magnetically induced electrical switching properties*. Nanoscale, 2013. **5**(11): p. 4917-22.
27. Zhang, G. and D. Wang, *Colloidal lithography--the art of nanochemical patterning*. Chem Asian J, 2009. **4**(2): p. 236-45.
28. Yang, S.M., et al., *Nanomachining by colloidal lithography*. Small, 2006. **2**(4): p. 458-75.
29. Mohammad, M., et al., *Fundamentals of Electron Beam Exposure and Development*, in *Nanofabrication*, M. Stepanova and S. Dew, Editors. 2012, Springer Vienna. p. 11-41.
30. Long, N.N., et al., *Synthesis and optical properties of colloidal gold nanoparticles*. Journal of Physics: Conference Series, 2009. **187**(1): p. 012026.
31. Pérez-Juste, J., et al., *Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2005. **249**(17-18): p. 1870-1901.
32. Sherry, L.J., et al., *Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver triangular nanoprisms*. Nano Lett, 2006. **6**(9): p. 2060-5.
33. Dong, X., et al., *Synthesis of Triangular Silver Nanoprisms by Stepwise Reduction of Sodium Borohydride and Trisodium Citrate*. The Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(5): p. 2070-2074.
34. Choi, S.-I., et al., *Synthesis and characterization of Pt9Co nanocubes with high activity for oxygen reduction*. Chemical Communications, 2010. **46**(27): p. 4950-4952.
35. Wang, Y., et al., *Synthesis of Ag Nanocubes 18-32 nm in Edge Length: The Effects of Polyol on Reduction Kinetics, Size Control, and Reproducibility*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(5): p. 1941-1951.
36. Chen, S., Z. Fan, and D.L. Carroll, *Silver Nanodisks: Synthesis, Characterization, and Self-Assembly*. The Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(42): p. 10777-10781.
37. Son, J.G., et al., *Guided formation of sub-5 nm interstitial gaps between plasmonic nanodisks*. Nanoscale, 2015. **7**(18): p. 8338-8342.
38. Liu, M., et al., *Facile synthesis of Pd-Ir bimetallic octapods and nanocages through galvanic replacement and co-reduction, and their use for hydrazine decomposition*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(28): p. 11822-11829.
39. Vimala, K., et al., *Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application*. Carbohydrate Polymers, 2009. **75**(3): p. 463-471.
40. Khatoon, U.T., et al. *Synthesis and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method*. in *Nanoscience, Engineering and Technology (ICONSET), 2011 International Conference on*. 2011.
41. Menezes, W.G., et al., *Synthesis of stable AuAg bimetallic nanoparticles encapsulated by diblock copolymer micelles*. Nanoscale, 2012. **4**(5): p. 1658-64.
42. Yamamoto, H., et al., *N,N-Dimethylformamide-stabilized gold nanoclusters as a catalyst for the reduction of 4-nitrophenol*. Nanoscale, 2012. **4**(14): p. 4148-54.

43. Li, D., Q. He, and J. Li, *Smart core/shell nanocomposites: intelligent polymers modified gold nanoparticles*. Adv Colloid Interface Sci, 2009. **149**(1-2): p. 28-38.
44. Njagi, J.I. and D.V. Goia, *Nitrilotriacetic acid: a novel reducing agent for synthesizing colloidal gold*. J Colloid Interface Sci, 2014. **421**: p. 27-32.
45. Fei, J., et al., *Responsive helical self-assembly of AgNO<sub>3</sub> and melamine through asymmetric coordination for Ag nanochain synthesis*. Small, 2013. **9**(7): p. 1021-4.
46. Zaheer, Z. and Rafiuddin, *Multi-branched flower-like silver nanoparticles: Preparation and characterization*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. **384**(1-3): p. 427-431.
47. Son, S.U., et al., *Facile Synthesis of Various Phosphine-Stabilized Monodisperse Palladium Nanoparticles through the Understanding of Coordination Chemistry of the Nanoparticles*. Nano Letters, 2004. **4**(6): p. 1147-1151.
48. Ananth, A.N., et al., *PVA and BSA stabilized silver nanoparticles based surface-enhanced plasmon resonance probes for protein detection*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **85**(2): p. 138-44.
49. El Badawy, A.M., et al., *The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles*. Sci Total Environ, 2012. **429**: p. 325-31.
50. Li, D., et al., *Thermosensitive Nanostructures Comprising Gold Nanoparticles Grafted with Block Copolymers*. Advanced Functional Materials, 2007. **17**(16): p. 3134-3140.
51. Wei, D., et al., *The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity*. Carbohydr Res, 2009. **344**(17): p. 2375-82.
52. Kumar, B., et al., *Sonochemical Synthesis of Silver Nanoparticles Using Starch: A Comparison*. Vol. 2014. 2014. 8.
53. El-Sheikh, M.A., *A Novel Photosynthesis of Carboxymethyl Starch-Stabilized Silver Nanoparticles*. Vol. 2014. 2014. 11.
54. Yan, X., et al., *One-pot synthesis of polypeptide-gold nanoconjugates for in vitro gene transfection*. ACS Nano, 2012. **6**(1): p. 111-7.
55. Rodríguez-Torres, M.d., et al., *UV photochemical synthesis of heparin-coated gold nanoparticles*. Gold Bulletin, 2014. **47**(1-2): p. 21-31.
56. Xia, N., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction with hyaluronan*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(2): p. 956-961.
57. Vigneshwaran, N., et al., *A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch*. Carbohydrate Research, 2006. **341**(12): p. 2012-2018.
58. Stewart, M.E., et al., *Nanostructured Plasmonic Sensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 494-521.
59. Gill, R., K. Goeken, and V. Subramaniam, *Fast, single-step, and surfactant-free oligonucleotide modification of gold nanoparticles using DNA with a positively charged tail*. 2013, The Royal Society of Chemistry. p. 11400-11402.
60. Moirangthem, R.S., et al., *Enhanced localized plasmonic detections using partially-embedded gold nanoparticles and ellipsometric measurements*. Biomedical Optics Express, 2012. **3**(5): p. 899-910.
61. Song, H.D., et al., *On-Chip Colorimetric Detection of Cu<sup>2+</sup> Ions via Density-Controlled Plasmonic Core-Satellites Nanoassembly*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(16): p. 7980-7986.
62. Nagatsuka, T., et al., *Localized Surface Plasmon Resonance Detection of Biological Toxins Using Cell Surface Oligosaccharides on Glyco Chips*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(10): p. 4173-4180.
63. Avasthi, D.K., et al., *Synthesis of plasmonic nanocomposites for diverse applications*. J Nanosci Nanotechnol, 2010. **10**(4): p. 2705-12.
64. Fong, K.E. and L.Y. Yung, *Localized surface plasmon resonance: a unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection*. Nanoscale, 2013. **5**(24): p. 12043-71.



65. Zhao, J., et al., *Resonance Localized Surface Plasmon Spectroscopy: Sensing Substrate and Inhibitor Binding to Cytochrome P450*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(34): p. 13084-13088.
66. Lan, T., et al., *A sensitive, universal and homogeneous method for determination of biomarkers in biofluids by resonance light scattering correlation spectroscopy (RLSCS)*. Talanta, 2013. **116**: p. 501-7.
67. Guo, L. and D.-H. Kim, *LSPR biomolecular assay with high sensitivity induced by aptamer–antigen–antibody sandwich complex*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **31**(1): p. 567-570.
68. Sagle, L.B., et al., *Advances in localized surface plasmon resonance spectroscopy biosensing*. Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(8): p. 1447-62.
69. Zhang, Y., et al., *Synthesis, properties, and optical applications of noble metal nanoparticle-biomolecule conjugates*. Chinese Science Bulletin, 2012. **57**(2-3): p. 238-246.
70. Guo, X., *Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review*. Journal of Biophotonics, 2012. **5**(7): p. 483-501.
71. Barnes, W.L., A. Dereux, and T.W. Ebbesen, *Surface plasmon subwavelength optics*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 824-30.
72. Cytodiagnosics, *Introduction to Gold Nanoparticle Characterization*. 2015, Cytodiagnosics Inc.
73. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, *Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing*. Annu Rev Phys Chem, 2007. **58**: p. 267-97.
74. Tighilt, F.-Z., et al., *Localized surface plasmon resonance interfaces coated with poly[3-(pyrrolyl)carboxylic acid] for histidine-tagged peptide sensing*. Analyst, 2011. **136**(20): p. 4211-4216.
75. Soares, L., et al., *Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensing using gold nanotriangles: detection of DNA hybridization events at room temperature*. Analyst, 2014. **139**(19): p. 4964-73.
76. Swierczewska, M., et al., *High-sensitivity nanosensors for biomarker detection()*. Chemical Society reviews, 2012. **41**(7): p. 2641-2655.
77. Cottat, M., et al., *Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensor for the Protein Detection*. Plasmonics, 2013. **8**(2): p. 699-704.
78. Fratila, R.M., et al., *Strategies for the Biofunctionalization of Gold and Iron Oxide Nanoparticles*. Langmuir, 2014. **30**(50): p. 15057-15071.
79. Moros, M., et al., *Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications*. Nanoscale, 2010. **2**(9): p. 1746-55.
80. Wang, H., et al., *Assembly of DNA-functionalized gold nanoparticles on electrospun nanofibers as a fluorescent sensor for nucleic acids*. Chemical Communications, 2013. **49**(49): p. 5568-5570.
81. Ruiz-Hernández, E., A. Baeza, and M. Vallet-Regí, *Smart Drug Delivery through DNA/Magnetic Nanoparticle Gates*. ACS Nano, 2011. **5**(2): p. 1259-1266.
82. Jayagopal, A., et al., *Hairpin DNA-Functionalized Gold Colloids for the Imaging of mRNA in Live Cells*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(28): p. 9789-9796.
83. technologies, L., *Carbodiimide Crosslinker Chemistry*, E.c. crosslinker, Editor. 2015, Thermo Fisher Scientific Inc.
84. Krilov, L.R., *Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2011. **9**(1): p. 27-32.
85. Thompson, W.W., et al., *Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States*. JAMA, 2003. **289**(2): p. 179-86.
86. Mould-Quevedo, J.F., et al., *Direct medical costs of treating Mexican children under 2 years of age with respiratory syncytial virus*. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 2012. **69**: p. 111-115.

87. McGivney Iv, J.B., et al., *Evaluation of a synthetic peptide as a replacement for the recombinant fusion protein of respiratory syncytial virus in a potency ELISA*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **54**(3): p. 572-576.
88. Jartti, T., et al., *New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children*. Paediatric Respiratory Reviews, 2013. **14**(1): p. 38-45.
89. Hu, A., et al., *Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 149-54.
90. Agrawal, A., et al., *Real-Time Detection of Virus Particles and Viral Protein Expression with Two-Color Nanoparticle Probes*. Journal of Virology, 2005. **79**(13): p. 8625-8628.
91. Tripp, R.A., et al., *Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection*. Int J Nanomedicine, 2007. **2**(1): p. 117-24.
92. Chattopadhyay, P.K., et al., *Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 972-977.
93. Bentzen, E.L., et al., *Progression of Respiratory Syncytial Virus Infection Monitored by Fluorescent Quantum Dot Probes*. Nano Letters, 2005. **5**(4): p. 591-595.
94. Hudson, S. and G. Chumanov, *Bioanalytical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**(3): p. 679-686.
95. Liu, H., et al., *Single molecule detection from a large-scale SERS-active Au79Ag21 substrate*. Sci. Rep., 2011. **1**.
96. Driskell, J.D., et al., *Rapid and Sensitive Detection of Rotavirus Molecular Signatures Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. PLoS ONE, 2010. **5**(4): p. e10222.
97. Shanmukh, S., et al., *Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**(6): p. 1551-1555.
98. Mayer, K.M. and J.H. Hafner, *Localized surface plasmon resonance sensors*. Chem Rev, 2011. **111**(6): p. 3828-57.
99. Stuart, D.A., et al., *Biological applications of localised surface plasmonic phenomena*. IEE Proc Nanobiotechnol, 2005. **152**(1): p. 13-32.
100. Haes, A. and R. Van Duyne, *A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **379**(7-8): p. 920-930.
101. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discussions of the Faraday Society, 1951. **11**(0): p. 55-75.
102. Frens, G., *controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*. Nature Physical Science, 1973. **241**: p. 20-22.
103. Battocchio, C., et al., *Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols: A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure*. The Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(36): p. 19571-19578.
104. Hoppe, C.E., et al., *One-Step Synthesis of Gold and Silver Hydrosols Using Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) as a Reducing Agent*. Langmuir, 2006. **22**(16): p. 7027-7034.
105. Khanna, P.K., et al., *PVA stabilized gold nanoparticles by use of unexplored albeit conventional reducing agent*. Materials Chemistry and Physics, 2005. **92**(1): p. 229-233.
106. Tejamaya, M., et al., *Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media*. Environmental Science & Technology, 2012. **46**(13): p. 7011-7017.
107. Tajammul Hussain, S., M. Iqbal, and M. Mazhar, *Size control synthesis of starch capped-gold nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, 2009. **11**(6): p. 1383-1391.
108. Bin Ahmad, M., et al., *Synthesis of Silver Nanoparticles in Chitosan, Gelatin and Chitosan/Gelatin Bionanocomposites by a Chemical Reducing Agent and Their Characterization*. Molecules, 2011. **16**(9): p. 7237.

109. Ayala, G., et al., *A Simple and Green Method for Synthesis of Ag and Au Nanoparticles using Biopolymers and Sugars as Reducing Agent*. MRS Online Proceedings Library, 2012. **1386**: p. null-null.
110. Tue Anh, N., et al., *Synthesis of alginate stabilized gold nanoparticles by  $\gamma$ -irradiation with controllable size using different  $Au^{3+}$  concentration and seed particles enlargement*. Radiation Physics and Chemistry, 2010. **79**(4): p. 405-408.
111. Saha, S., et al., *Photochemical Green Synthesis of Calcium-Alginate-Stabilized Ag and Au Nanoparticles and Their Catalytic Application to 4-Nitrophenol Reduction*. Langmuir, 2010. **26**(4): p. 2885-2893.
112. Ma, Z. and H. Han, *One-step synthesis of cystine-coated gold nanoparticles in aqueous solution*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **317**(1–3): p. 229-233.
113. Nowduri, A., et al., *Kinetics and Mechanism of Oxidation of L-Cystine by Hexacyanoferrate(III) in Alkaline Medium*. E-Journal of Chemistry, 2009. **6**(1).
114. Khan, M.M.K., Shafeer; Lee, Jin-Tae; Cho, Moo-Hwan, *Synthesis of Cysteine Capped Silver Nanoparticles by Electrochemically Active Biofilm and their Antibacterial Activities*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2012. **33**(8): p. 2592-2596.
115. Suramwar, N.V., S.R. Thakare, and N.T. Khaty, *One pot synthesis of copper nanoparticles at room temperature and its catalytic activity*. Arabian Journal of Chemistry, (0).
116. Saikova, S.V., et al., *Conditions for the formation of copper nanoparticles by reduction of copper(II) ions with hydrazine hydrate solutions*. Russian Journal of General Chemistry, 2010. **80**(6): p. 1122-1127.
117. Sarkar, A., T. Mukherjee, and S. Kapoor, *PVP-Stabilized Copper Nanoparticles: A Reusable Catalyst for "Click" Reaction between Terminal Alkynes and Azides in Nonaqueous Solvents*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(9): p. 3334-3340.
118. Xiong, J., et al., *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid*. Green Chemistry, 2011. **13**(4): p. 900-904.
119. Kar, P. and A. Mishra, *The Role of Polyvinyl Alcohol in One-Step Chemical Synthesis of Water Based Copper Nanofluid*. Nanoscience and Nanotechnology Letters, 2013. **5**(8): p. 937-940.
120. Thi My Dung, D., et al., *The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 2011. **2**(2): p. 025004.
121. Polshettiwar, V. and R.S. Varma, *Chapter 1 Fundamentals of Aqueous Microwave Chemistry*, in *Aqueous Microwave Assisted Chemistry*. 2010, The Royal Society of Chemistry. p. 1-9.
122. Hussain, N. *Synthesis, Characterization and Application of Ni Nanoparticles Using Bimolecules as Capping Agent*. in *International Scientific Spring*. 2010. Islamabad, Pakistan
123. Zhao, X., et al., *Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using sodium alginate and their antibacterial activity*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **444**(0): p. 180-188.
124. Logeswari, P., S. Silambarasan, and J. Abraham, *Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property*. Journal of Saudi Chemical Society, 2015. **19**(3): p. 311-317.
125. Balavandy, S., et al., *Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method*. Chemistry Central Journal, 2014. **8**(1): p. 11.
126. Khodashenas, B. and H.R. Ghorbani, *Synthesis of silver nanoparticles with different shapes*. Arabian Journal of Chemistry, (0).
127. Baruwati, B., V. Polshettiwar, and R.S. Varma, *Glutathione promoted expeditious green synthesis of silver nanoparticles in water using microwaves*. Green Chemistry, 2009. **11**(7): p. 926-930.
128. Hayes, B., *Microwave synthesis, chemistry at the speed of the light* 2002, USA: CEM Publishing. 291.

129. Ravindran, A., P. Chandran, and S.S. Khan, *Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **105**(0): p. 342-352.
130. Festag, G., et al., *Biofunctionalization of Metallic Nanoparticles and Microarrays for Biomolecular Detection*, in *Nanotechnologies for the Life Sciences*. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
131. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Vol. 368. 2010. 1333-1383.
132. Lai, G., et al., *Streptavidin-Functionalized Silver-Nanoparticle-Enriched Carbon Nanotube Tag for Ultrasensitive Multiplexed Detection of Tumor Markers*. Advanced Functional Materials, 2011. **21**(15): p. 2938-2943.
133. Sharma, P., B. Kumar, and R. Suri, *Antibody Functionalised Gold Nanoprobes Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Phenylurea Herbicide*. Environment and Pollution, 2011. **1**(1).
134. Karmani, L., et al., *Antibody-functionalized nanoparticles for imaging cancer: influence of conjugation to gold nanoparticles on the biodistribution of <sup>89</sup>Zr-labeled cetuximab in mice*. Contrast Media & Molecular Imaging, 2013. **8**(5): p. 402-408.
135. Fischer, M.E., *Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach*, in *Surface Plasmon Resonance*, N.J. Mol and M.J.E. Fischer, Editors. 2010, Humana Press. p. 55-73.
136. Schladt, T.D., et al., *Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment*. Dalton Transactions, 2011. **40**(24): p. 6315-6343.
137. Arruebo, M., M. Valladares, and Á. González-Fernández, *Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications*. Journal of Nanomaterials, 2009. **2009**: p. 24.
138. Jiang, S., et al., *Surface-functionalized nanoparticles for biosensing and imaging-guided therapeutics*. Nanoscale, 2013. **5**(8): p. 3127-3148.
139. Chrisnasari, R., L. Wijaya, and M. Purwato. *Development of DNA Biosensor Based on Silver Nanoparticles UV-vis Absorption Spectra for Escherichia coli Detection*. in *ICBS 2015*. 2013. Yogyakarta.
140. Citartan, M., et al., *Use of UV-vis-NIR spectroscopy to monitor label-free interaction between molecular recognition elements and erythropoietin on a gold-coated polycarbonate platform*. Talanta, 2014. **126**(0): p. 103-109.
141. Choo, J., *Biosensors Using Surface-Enhanced Raman Scattering*, in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, D. Li, Editor. 2014, Springer US. p. 1-6.
142. Barlen, B., et al., *Detection of Salmonella by Surface Plasmon Resonance*. Sensors, 2007. **7**(8): p. 1427.
143. Lee, J.-H., et al., *Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. **9**(7): p. 1018-1026.
144. Park, T.J., et al., *Development of label-free optical diagnosis for sensitive detection of influenza virus with genetically engineered fusion protein*. Talanta, 2012. **89**(0): p. 246-252.
145. Vidic, J., *Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Detection of PB1-F2 Influenza A Virus Protein in Infected Biological Samples*. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, 2013. **S7**.
146. Bawage, S.S., et al., *Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus*. Advances in Virology, 2013. **2013**: p. 26.
147. Sampath, R., et al., *Global Surveillance of Emerging Influenza Virus Genotypes by Mass Spectrometry*. PLoS ONE, 2007. **2**(5): p. e489.
148. Chen, K.-F., et al., *RT-PCR and Electrospray Ionization Mass Spectrometry (RT-PCR/ESI-MS) for Identifying Acute Viral Upper Respiratory Tract Infections*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2011. **69**(2): p. 179-186.
149. Demirel, M.C., et al., *Bio-organism sensing via surface enhanced Raman spectroscopy on controlled metal/polymer nanostructured substrates*. Biointerphases, 2009. **4**(2): p. 35-41.
150. Hudson, S.D. and G. Chumanov, *Bioanalytical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy)*. Anal Bioanal Chem, 2009. **394**(3): p. 679-86.

151. Anker, J.N., et al., *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Nat Mater, 2008. **7**(6): p. 442-453.
152. Amendola, V. and M. Meneghetti, *Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(11): p. 4277-4285.
153. Bhui, D.K., et al., *Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution*. Journal of Molecular Liquids, 2009. **145**(1): p. 33-37.
154. Khatoon, U.T., G.V.S. Nageswara Rao, and M.K. Mohan. *Synthesis and characterization of copper nanoparticles by chemical reduction method*. in *Advanced Nanomaterials and Emerging Engineering Technologies (ICANMEET), 2013 International Conference on*. 2013.
155. Kim, K., Y. Oh, and D. Kim, *Enhanced Optical Biosensors Based on Nanoplasmonics*, in *Bio-Nanotechnology*. 2013, Blackwell Publishing Ltd. p. 252-269.

## **APENDICES**

## APENDICE A

### REPETICIONES PARA LOS EXPERIMENTOS DE L-CISTEÍNA Y ALGINATO DE SODIO

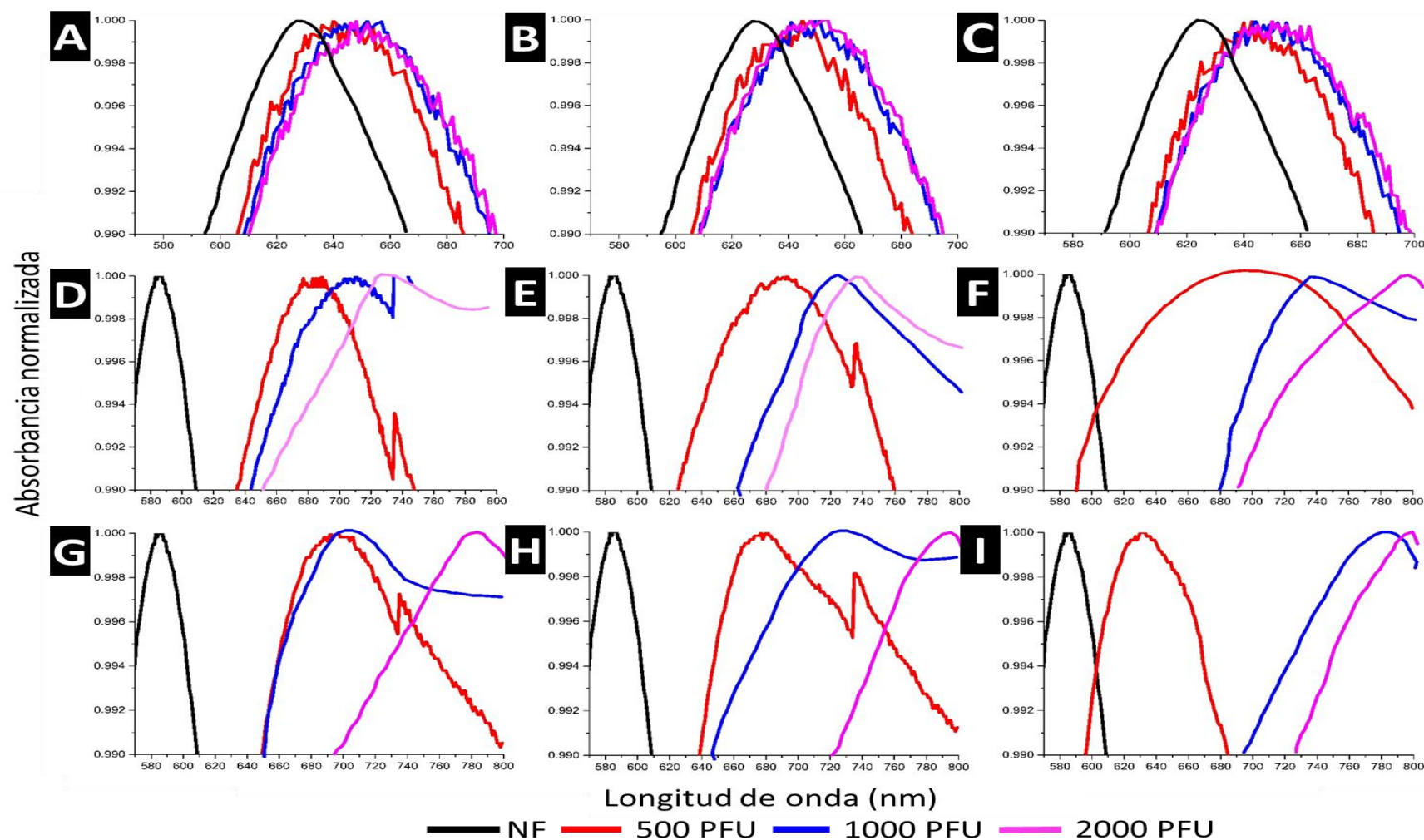


Figura 46 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas funcionalizadas de oro a 30 min (A, B y C) 60 min (D, E y F) y 120 min (G, H e I).

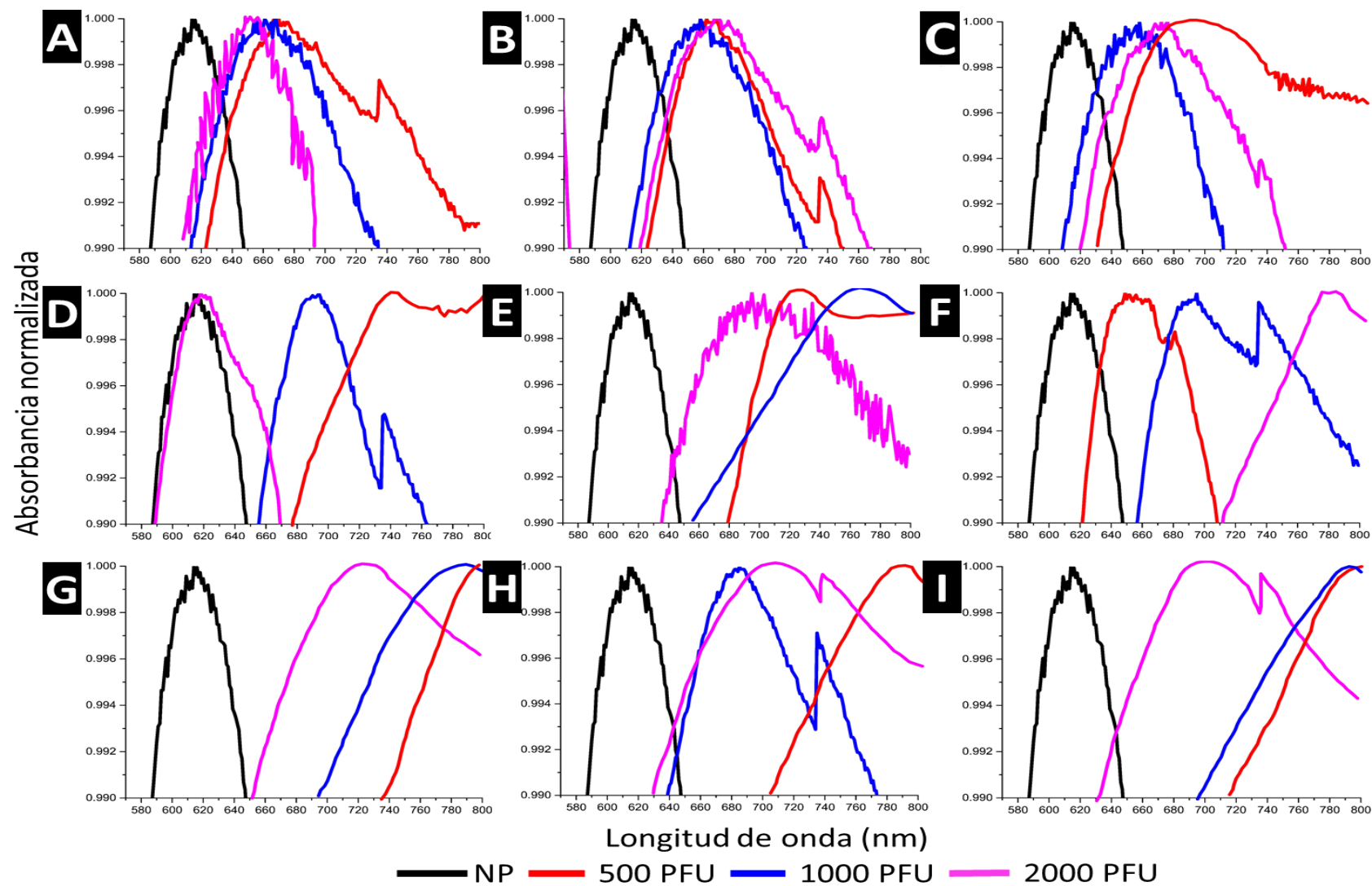


Figura 47 Análisis UV-vis para los experimentos de detección de RSV a diferentes concentraciones utilizando nanopartículas no funcionalizadas de oro a 30 min (A, B y C) 60 min (D, E y F) y 120 min (G, H e I).



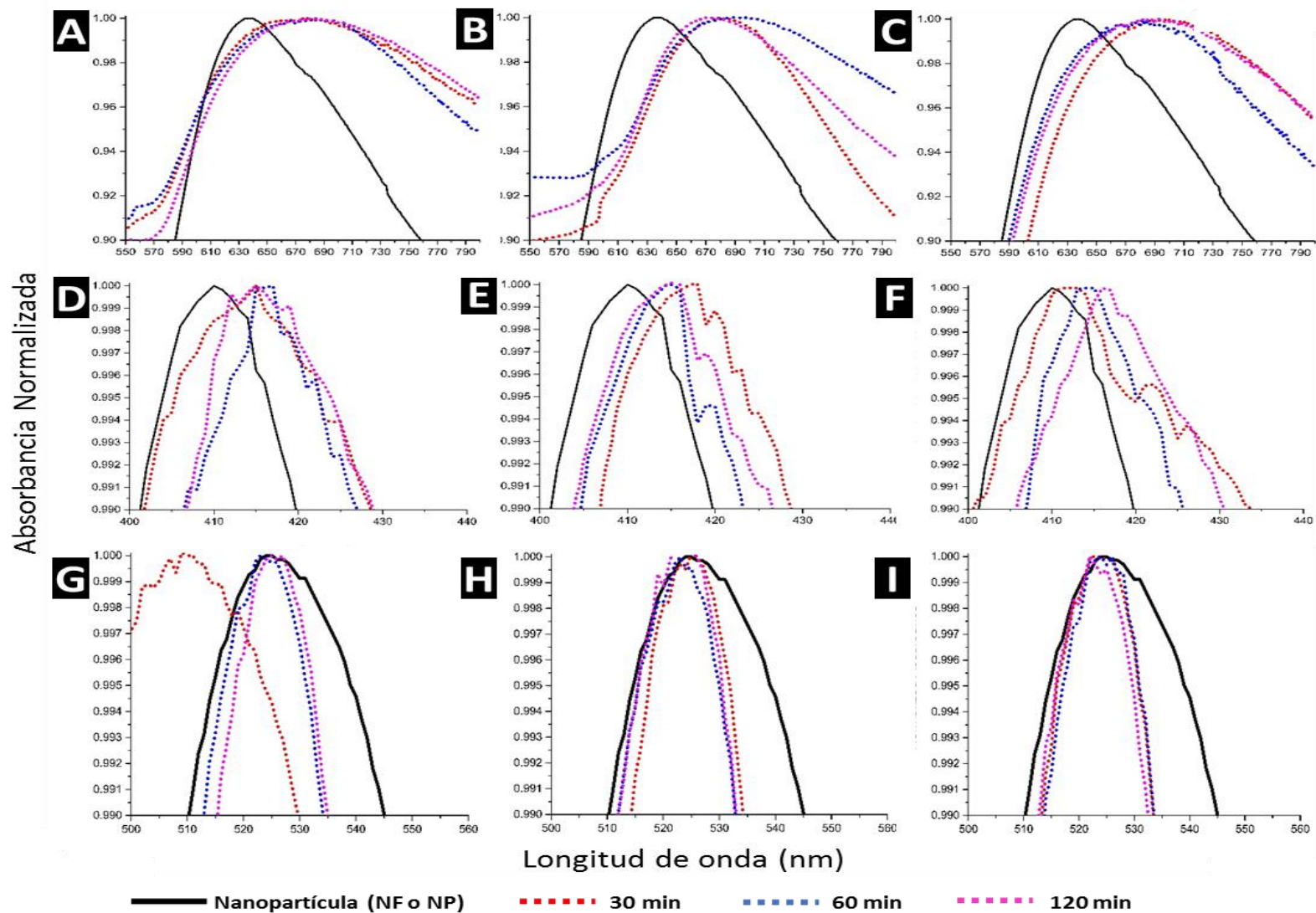


Figura 48 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.

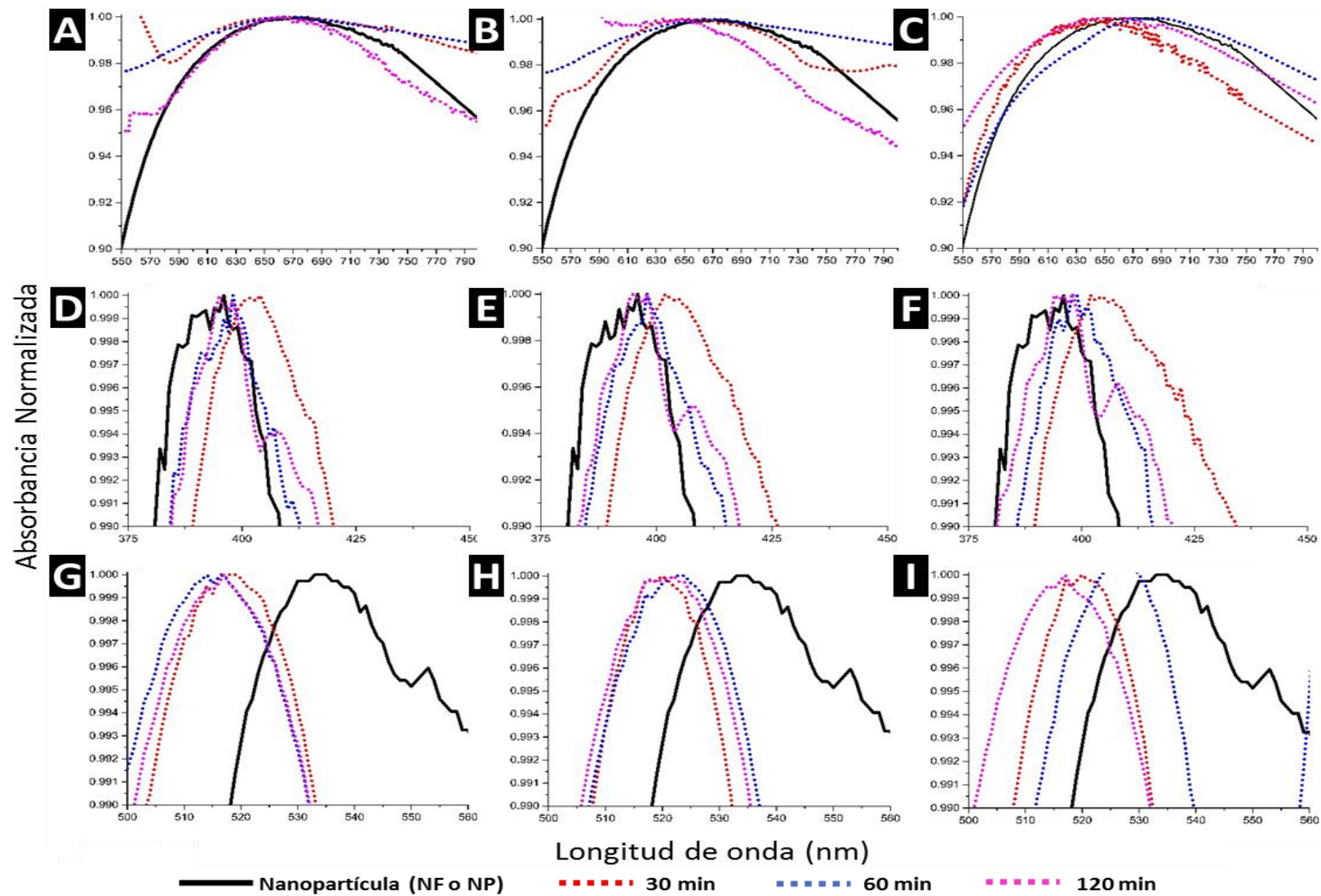


Figura 49 Análisis UV-vis para la detección de 500 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas (control) de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.

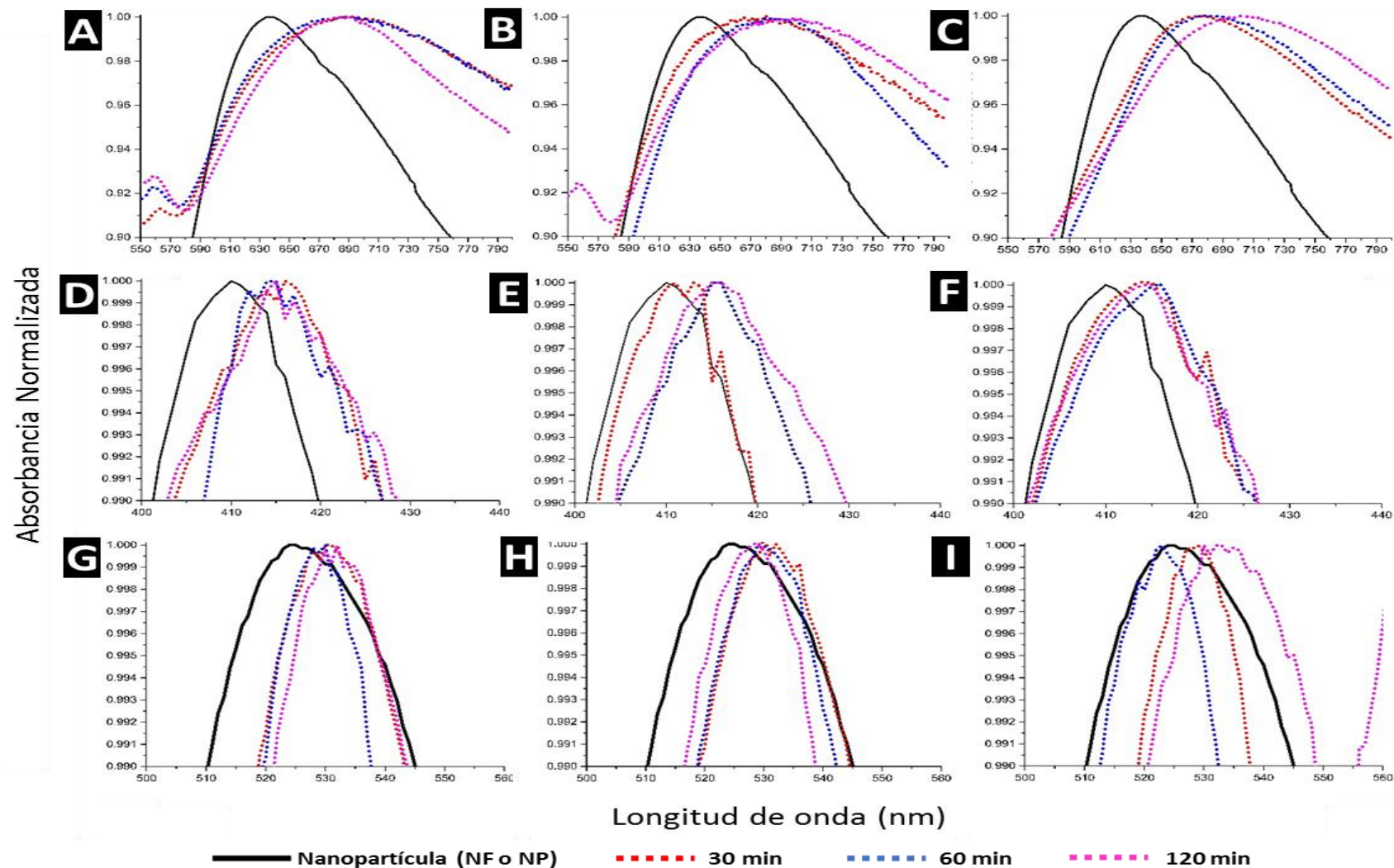


Figura 50 Análisis UV-vis para la detección de 1000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.



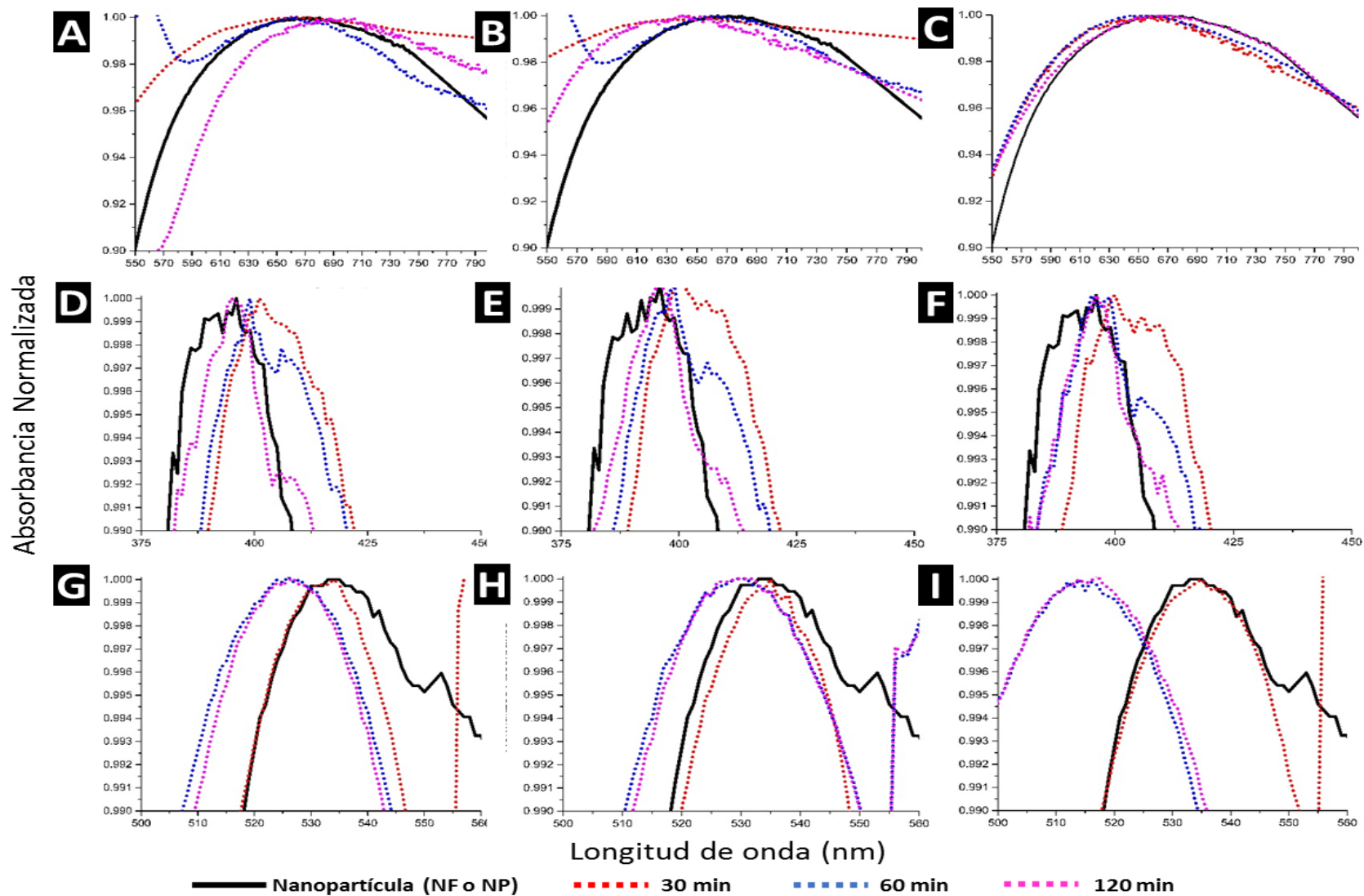


Figura 51 Análisis UV-vis para la detección de 1000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas (control) de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.

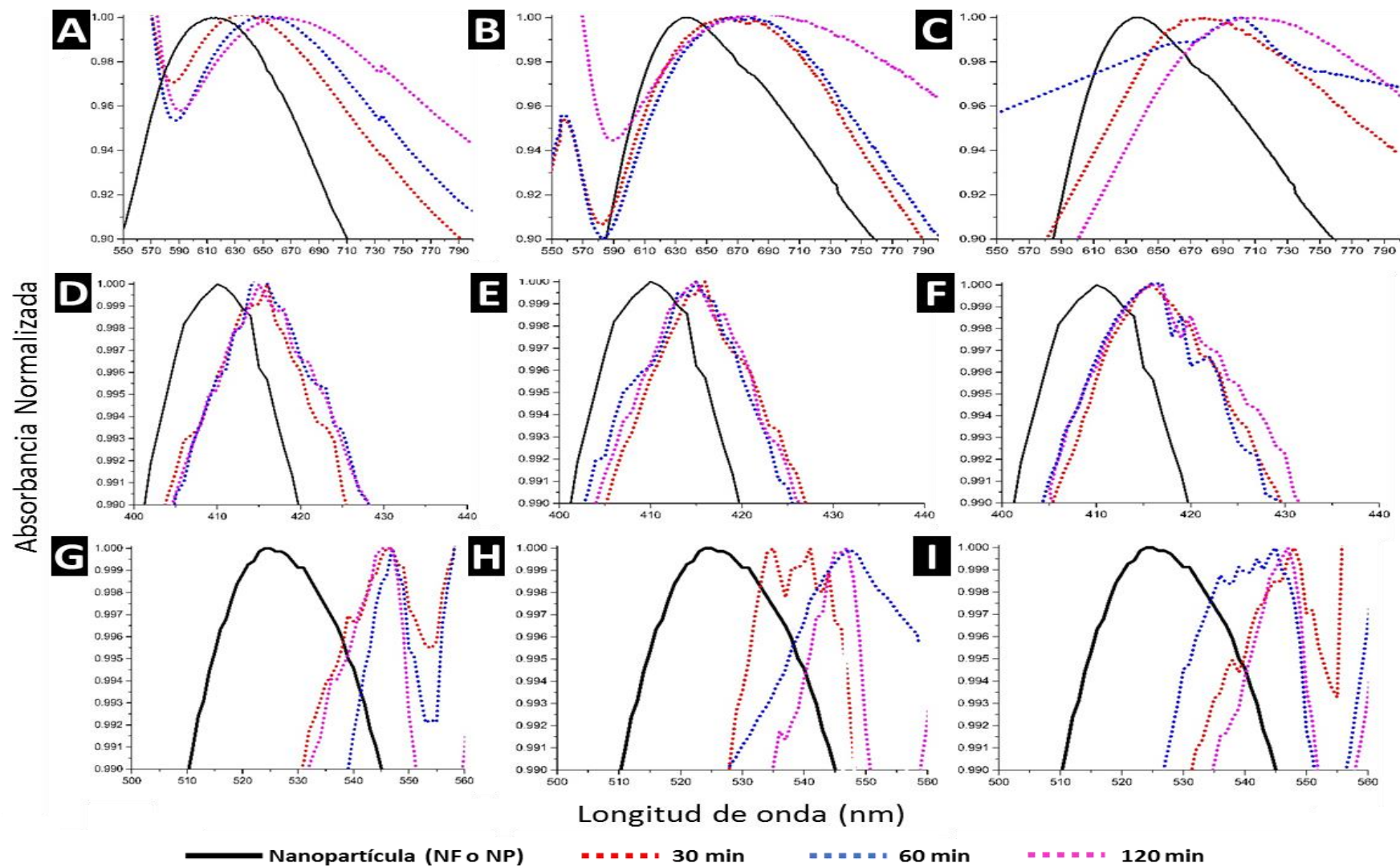


Figura 52 Análisis UV-vis para la detección de 2000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas funcionalizadas de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.

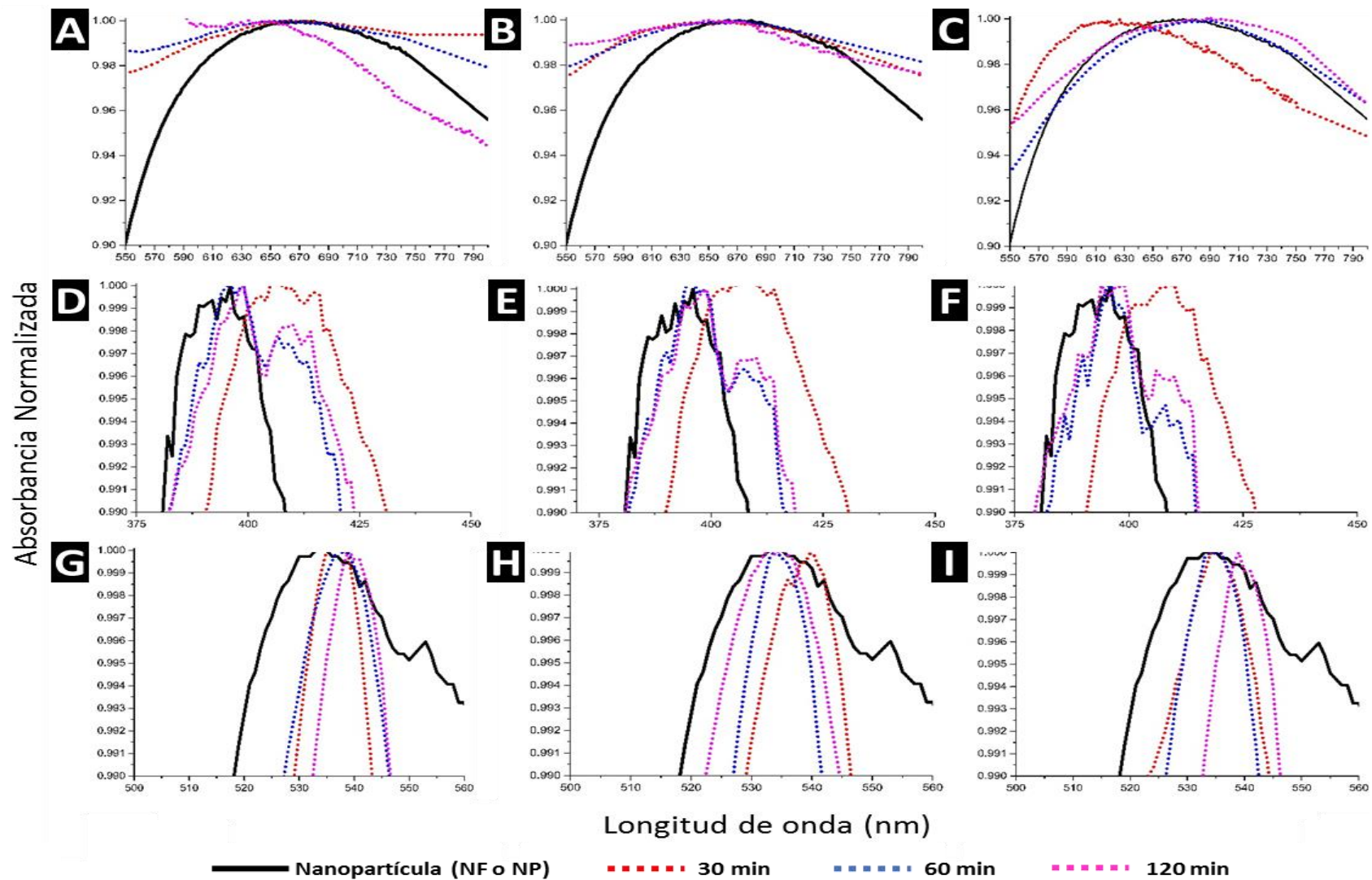


Figura 53 Análisis UV-vis para la detección de 2000 PFU de RSV a 30, 60 y 120 min. utilizando nanopartículas (control) de cobre (A, B y C), plata (D, E y F) y oro (G, H e I) con 3 réplicas.